

**Immunochemische Untersuchungen zur Funktion der
Einzelproteine der 30S-Untereinheit von
Escherichia Coli-Ribosomen**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie (23)
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Reinhard Maschler
aus Karlsruhe

1973

**Immunochemische Untersuchungen zur Funktion der
Einzelproteine der 30S-Untereinheit von
Escherichia Coli-Ribosomen**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie (23)
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Reinhard Maschler

aus Karlsruhe



1. Referent: Dr. G. Stöffler

2. Referent: Professor Dr. E. R. Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.9.1973

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	6
Material und Methoden	17
Präparation der Ribosomen, der ribosomalen Unter- einheiten, der Enzymfraktion, der Initiationsfak- toren IF1, IF2 und des Elongationsfaktors EF-Tu	17
Präparation der ^{14}C -Phe-tRNS und der ^3H -f-Met-tRNS	22
Immunisieren, Gewinnen der Seren, Präparation der 7S-IgG-Fraktion, Charakterisierung der Seren, Rein- heitskriterien, chromatographische Anreicherung der 7S-Antikörper aus Hyperimmunseren sowie enzymati- sche Spaltung der 7S-Antikörper mit Papain	24
Messung der Poly-U-abhängigen Poly-Phe-Synthese	35
Messung der enzymatischen Bindung von Phe-tRNS und f-Met-tRNS an das Ribosom	36
Messung der Bindung der beiden Antibiotika Spectino- mycin (Spc) und Streptomycin (Sm) an das Ribosom	38
Ergebnisse	40
Beeinflussung der Poly-U-abhängigen Poly-Phe-Syn- these durch spezifische 7S-Antikörper und deren monovalente Fragmente	40
Optimierung des Systems für das spezielle Problem	42
Abgrenzung von spezifischen und unspezifischen Effekten	43
Vergleich der Wirkungen von spezifischen 7S-Anti- körpern (IgG) und deren monovalenten Fragmenten	43
Die unterschiedlichen Bereiche der Peptidsynthese- Kinetik unter dem Einfluß von Antikörpern	48
Individualspezifitäten verschiedener Antiseren	52
Möglichkeiten der Auswertung	55
Auswertung	56

Beeinflussung der EF-Tu-abhängigen Bindung von Phe-tRNS in der "A-site" der 30S-Untereinheit des Ribosoms durch Antikörperfragmente	60
Optimierung des Systems	61
Auswertung	63
Abgrenzung von spezifischen und unspezifischen Effekten	67
Individualspezifitäten verschiedener Antiseren	67
Beeinflussung der Formation des f-Met-tRNS-IF2-30S-Initiationskomplexes durch Antikörperfragmente	69
Optimierung des Systems	69
Auswertung	69
Abgrenzung von spezifischen und unspezifischen Effekten	72
Beeinflussung der Bindung von Spectinomycin (Spc) und Streptomycin (Sm) durch Antikörperfragmente	72
Optimierung des Systems (Spc und Sm)	73
Auswertung (Spc)	73
Auswertung (Sm)	77
Topographie des Ribosoms: Problem, Ergebnisse und Diskussion	81
Die Zugänglichkeit der einzelnen Proteine der 30S-Untereinheit für Antikörper	81
Der inhibitorische Effekt der Antikörper auf ein so komplexes System wie das Ribosom	84
Alle Proteine der 30S-Untereinheit sind Antikörpern zugänglich	85
Diskussion	86
Wie kann der Nachweis der Beteiligung eines einzelnen ribosomalen Proteins an bestimmten Funktionen des Ribosoms erbracht werden?	86

Rekonstitution	86
Additionsversuche	87
Chemische Modifikation	87
Antikörpermethode	87
Allgemeine Limitationen	88
Nichtunterscheidbarkeit von allosterischen und direkten Wirkungen	88
Gesamtantikörper eines Tieres und spezifische Antikörper	89
Diskussion der Ergebnisse	89
Zusammenfassung	99
Verwendete Puffer	101
Literatur	103
Lebenslauf	

Einleitung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit den Ribosomen des Bakteriums Escherichia coli. Die dem Elektronenmikroskopiker auch als Paladesche Granula bekannten Ribosomen sind Ribonukleoproteidpartikel, die durch fraktionierte Zentrifugation einer Suspension aufgebrochener Zellen isoliert werden können. In der lebenden Zelle befinden sie sich im Zytoplasma, einzeln und als Polysomen aneinandergereiht. Die E. coli-Ribosomen bestehen aus ca. 38 % Protein und 62 % ribosomaler Ribonukleinsäure (rRNS). Man kann sie in Abhängigkeit von der Mg^{++} -Konzentration in zwei Untereinheiten dissoziieren und die Untereinheiten im Zuckerdichtegradienten voneinander trennen. Oft charakterisiert man die Ribosomen nach ihren Sedimentationsverhalten. Die mediumabhängigen Sedimentationskoeffizienten sind für undissoziierte Ribosomen 70S und für die beiden Untereinheiten 30S und 50S.

Die Molekulargewichte der drei Partikel sind folgende: 70S-Ribosom = $2,8 \cdot 10^6$ Dalton, 30S-Untereinheit = $0,9 \cdot 10^6$ Dalton und 50S-Untereinheit = $1,8 \cdot 10^6$ Dalton. Während die kleine Untereinheit elektronenmikroskopisch ein flaches diskusähnliches Partikel darstellt, das mit einer der flachen Regionen an der großen Untereinheit sitzt (1,2), ist die Gestalt der großen Untereinheit eher sphärisch kugelig zu nennen (1,2).

Der Aufbau der Untereinheiten aus Protein und RNS ist wie folgt zu beschreiben: 30S-Partikel: 21 individuelle, bis auf zwei, basische Proteine (3), S-Proteine genannt, da sie zu der "small subunit" gehören (4), mit Molekulargewichten zwischen 10 000 und 30 000 Dalton (Ausnahme S1 = 68 000 Dalton) (5) und eine rRNS mit dem Molekulargewicht $0,56 \cdot 10^6$ Dalton und dem Sedimentationskoeffizienten 16S; 50S-Partikel: 34 Proteine, L-Proteine genannt, da sie in der "large subunit" vorkommen (4), davon 30 basische (3), mit ähnlichen Molekulargewichten und zwei rRNS-Moleküle, eine 5S-RNS mit dem Molekulargewicht $0,04 \cdot 10^6$ Dalton und eine 23S-RNS mit dem Molekulargewicht $1,12 \cdot 10^6$ Dalton.

Die isoelektrischen Punkte liegen bei den Proteinen S6, L7 und L12 bei pH 5, bei S2, L8 und L9 bei über pH 6 und bei allen übrigen Proteinen bei pH-Werten von 8 - 12 (3). Nur zwei Proteine (L7/L12) haben fast dieselbe Primärstruktur (6, 126). Ribosomale Proteine wurden in den letzten Jahren nach verschiedenen Methoden charakterisiert: Zweidimensionale Elektrophorese, Aminosäurekomposition, Molekulargewichtsbestimmung, isoelektrischer Punkt, tryptische Peptide, immunologische Charakterisierung, α -Helix Gehalt, Sequenzanalysen, Ermittlung der an RNS bindenden Proteine, Proteinnachbarschaftsuntersuchungen, Bestimmung der Stöchiometrie der ribosomalen Proteine.

Eine bedeutende Aussage über die Struktur und Funktion des Ribosoms konnte gemacht werden, als es gelungen war, alle ribosomalen Proteine zu reinigen und zu isolieren (7,8,9,10,11, 12,13). Während frühere Untersuchungen zu einer Zahl von 13 verschiedenen Proteinen in der kleinen Untereinheit kamen, werden heute 21 Proteine generell akzeptiert (4). Damit trat aber ein Problem auf. Man hatte mit einem ungefähren Molekulargewicht eines Proteins von 20 000 Dalton gerechnet (14). Das durchschnittliche Molekulargewicht der Proteine der 30S-Untereinheit wurde mit 260 000 Dalton bestimmt (15). Die Summe der Molekulargewichte der 21 Proteine ergab jedoch ein Gesamtmolekulargewicht von ca. 400 000 Dalton, also 140 000 Dalton zuviel. Daraus ergab sich, daß die 30S-Untereinheit heterogen sein mußte. Exakte Messungen zeigten, daß dieses Zuviel an Proteinen durch Heterogenität der kleinen Untereinheit kompensiert wurde (16,17,18,19). Es waren nur sieben Proteine, die sicher in einer Kopie pro 16S RNS vorlagen (0,8 - 1,2 Kopien (137)). Man nannte sie "unit-proteins". Weitere sieben Proteine waren in weniger als einer Kopie, nämlich von 0,1 bis 0,6 (137), vorhanden, es waren die sogenannten "fractional-proteins". Die nach den Meßergebnissen dazwischen liegenden und methodologisch schwer klassifizierbaren Proteine wurden "marginal-proteins" genannt (17).

Es wurden im folgenden zwei Modelle postuliert: 1. Es gibt verschiedene Klassen von Ribosomen, die jeweils nur eine spe-

zifische Funktion erfüllen können. 2. Das Ribosom durchläuft verschiedene Funktionszustände, bei denen je nach Funktion Proteine dissoziieren oder assoziieren müssen.

Das zweite dynamische Modell ist nach allen bisherigen Untersuchungen (20,13,136,146), auf die z.T. noch eingegangen wird (s.Diskussion), das Wahrscheinlichere. Welche biologische Bedeutung diese Heterogenität besitzt, ist auch heute noch offen. Erst kürzlich fand z.B. Noll (pers.Mitteilung), daß 4 "fractional" Proteine, nämlich S1, S6, S21 und S12 mit einem höheren stöchiometrischen Wert (0,6) vorkommen. Für die in dieser Arbeit zu besprechenden Probleme ist es von großer Bedeutung zu wissen, welche Proteine am Ribosom benachbart sind. Dazu wurden bifunktionelle Reagenzien mit charakterisierten Längen (5,2 - 12,0 Å) benutzt (N.N.-Phenylendimaleimide und Dimethyladipimidate). Mittels solcher Reagenzien wurden Querverbindungen (cross links) zwischen den Proteinen S18 und S21, S5 und S8, S2 und S3, S13 und S19, S7 und S9 sowie evtl. S5 und S9 gefunden (21,148,153, R.Traut,pers.Mitteilung, L.C.Lutter, B.Bode, C.G.Kurland, G.Stöffler, unveröffentlichte Ergebnisse). Erwähnenswert ist jedoch auch, daß mit einem 5 Å-Reagenz keinerlei Querverbindungen gefunden wurden (C.G. Kurland, pers.Mitteilung). Die Bedeutung solcher querverbundener Proteine ist solange fraglich, wie man nicht die Überstruktur der ribosomalen Proteine genau kennt. Der α -Helix-Gehalt und β -Strukturen der Proteine dürfte in diesem Zusammenhang ebenfalls wichtig sein (149,150). Neben diesen auf chemischem Wege gefundenen Nachbarn gibt es auch Anhaltspunkte für "funktionelle" Nachbarschaft. So sind die Proteine S2, S3 und S14 an der "A"- und "P-site" der kleinen Untereinheit beteiligt (22,146). Die Gruppe der Proteine S4, S5, S12 ist wiederum von Bedeutung für das Verhalten des Ribosoms gegenüber dem Antibiotikum Streptomycin (130). Es wird an dieser Stelle die Frage gestellt, welche Rolle die Untereinheit für die Funktion des Ribosoms spielt.

Die Funktion des Ribosoms ist es, auf der Translationsebene der genetischen Informationsübermittlung, die auf einer

messenger-RNS (Boten-RNS) codierte genetische Nachricht zur Synthese eines Proteins, z.B. eines Enzyms, zu realisieren. Im Jahre 1958 stellte Crick das zentrale Dogma der Genetik auf: "DNS macht RNS, RNS macht Protein". Drei Syntheseschritte kann man für den zweiten Teil des Dogmas dabei unterscheiden: 1. die Initiation oder den Beginn der Synthese, 2. die Elongation oder Verlängerung der Proteinkette und 3. die Termination oder den Kettenabbruch, mit dem wir uns hier nicht beschäftigen wollen. Auf die genannten Vorgänge bei diesen Proteinsyntheseschritten wird in einigen Reviews ausführlich eingegangen (23,24,26,27,156,157). Zum besseren Verständnis dieser Arbeit sind in der Folge die wesentlichen Vorgänge zusammengefaßt.

Abb.1 (25) zeigt anschaulich, wie Initiation (mittlerer Kasten) und Elongation (großer Kasten) etwa ablaufen.

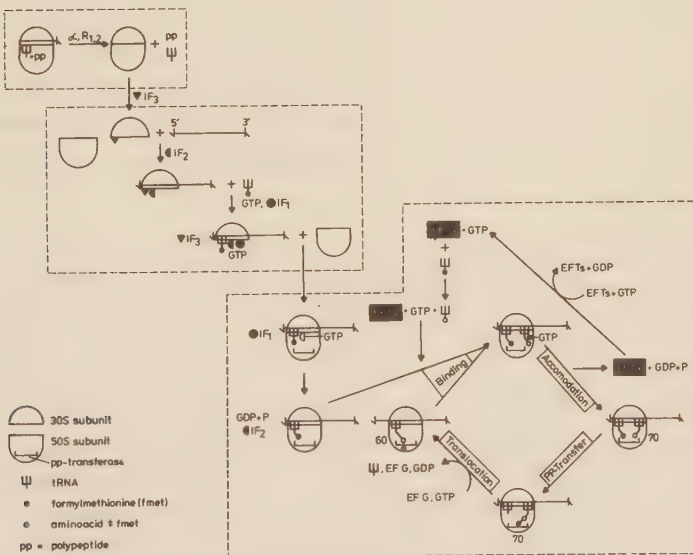


Abb.1 Termination, Initiation und Elongation der bakteriellen Proteinbiosynthese K. Nierhaus (25)

Um die an der Initiation beteiligten ribosomalen Proteine herauszufinden, wurde eine Initiationsfaktor 2 abhängige Bindung von f-Met-tRNS (formyl-Methionin ist die Aminosäure, die von den Initiatorcodonen AUG oder GUG ⁺) (28,29) codiert wird) an die 30S-Untereinheit untersucht (30,31). Zwei topographisch noch nicht lokalisierte hypothetische Bindungszentren sind für die Initiation und Elongation wichtig: die "A-site" (Aminoacyl-stelle) und die "P-site" (Peptidylstelle) auf der 50S-Untereinheit bzw. die diesen Stellen gegenüberliegenden Orte auf der 30S-Untereinheit, die hier der Einfachheit halber ebenso benannt sind. In der "P-site" wird zunächst die Initiator-tRNS, in Abhängigkeit der Initiationsfaktoren IF1 und IF2 an den Komplex 30S-Ribosom-IF3-AUG gebunden (32). Guanosintriphosphat (GTP), der Energielieferant (33-38), wird jedoch erst nach dieser Formation für die Assoziation der 50S-Untereinheit an den Komplex gebraucht (39,40), was man durch die Substitution des GTP-Analogons GMP-PCP, das nicht hydrolysierbar ist, zeigen kann (41,35,38). IF2 ist hochspezifisch in der Bindung von f-Met-tRNS an Ribosomen, alle anderen Aminosäuren einschließlich der unformylierten Met-tRNS sind inaktiv (42). Faktor IF3 ist in den Initiationsprozess miteinbezogen, wenn natürlicher messenger als Vorlage dient (43,44, 45) (s. Abb.1).

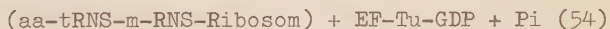
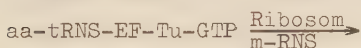
Es wurden weiter Versuche unternommen, um über den sich an die Initiation anschließenden Vorgang der Peptidkettenverlängerung (Elongation) am 70S-Ribosom etwas auszusagen. Die Elongation ist ebenfalls auf Abb.1 zu sehen. Hier sind vier Teilvorgänge zu unterscheiden: 1. die Besetzung des dem Initiatorcodon oder im weiteren Verlauf des jeweils vorausgegangenen Kodons folgenden Tripletts durch eine entsprechende Aminoacyl-tRNS (aa-tRNS) (Abb.1 Binding), 2. die für den Peptidyltransfer notwendige Akkomodation, d.h. das in Positionbringen der neuen Aminosäure und des Peptids (Abb.1: Accomodation), 3. der Peptidyltransfer von der "P-site" in die "A-site"

⁺) Auf der messenger-RNS befindliche Tripletts AUG und GUG bestehen aus den Nukleotiden Adenosin, Uracil u. Guanosin.

(Abb.1: PP-Transfer) und schließlich 4. die Translokation der messenger-RNS mit der neu synthetisierten Peptidyl-tRNS von der "A-Stelle" in die "P-Stelle". Dadurch wird die "A-site" oder auch Akzeptorstelle frei für eine neue aa-tRNS, um die Elongation fortzusetzen.

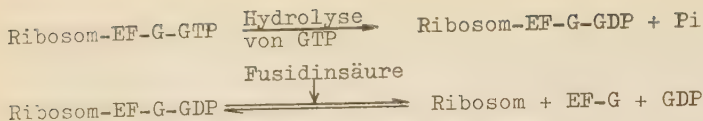
Drei Proteinfaktoren (47,48,49,155) sind neben der auf der 50S-Untereinheit lokalisierten Peptidyltransferase (50) für die Elongation wichtig: Es sind dies die Elongationsfaktoren EF-Tu, EF-Ts und EF-G (47,49). EF-Tu und EF-Ts liegen in der Zelle als T-Faktor (transfer-factor) (47) assoziiert vor und werden auch als solcher isoliert.

Nach der Bindung einer neuen aa-tRNS an das Ribosom findet die GTP-Hydrolyse statt. Gleichzeitig löst sich der Komplex EF-Tu-GDP vom Ribosom (51,52,53), um mittels EF-Ts (54,55) in Abhängigkeit von GTP über ein Intermediärstadium EF-Tu-EF-Ts (54) in den reaktiven Zustand EF-Tu-GTP zurückgeführt zu werden. Die Reaktion verläuft wahrscheinlich folgendermaßen:



Ein weiteres Mol GTP wird hydrolysiert während der Translokation (56). Hierbei ist der G-Faktor (G = ribosome dependent GTP ase activity) von entscheidender Bedeutung (57-60). Für die Phe-tRNS-Bindungsexperimente war es wichtig, daß die Translokation unterbrochen war, um zu garantieren, daß nur eine Phe-tRNS pro Ribosom bindet, u.z. in der "A-Stelle". Da man weiß, daß das Antibiotikum Fusidinsäure zweifach in dieser Hinsicht auf die Elongation einwirkt, wurde sie bei diesem Experiment eingesetzt. Fusidinsäure inhibiert sowohl die Elongation als auch die GTP'ase-Aktivität (57). Das Antibiotikum interferiert mit der EF-G-Funktion, es stabilisiert den Komplex zwischen EF-G, GTP und Ribosom (61). Der Vorgang verläuft etwa folgendermaßen (151):





Auch für die Termination sind drei Überstandsproteine R_1 , R_2 und R_3 notwendig (Abb.1). Im Gegensatz zu dem Schema werden sie nach der neuen Nomenklatur als RF1, RF2 und RF3 bezeichnet (164)⁺).

Von den aufgeführten Schritten wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht:

1. Welche Antikörper gegen spezifische Proteine der 30S-Untereinheit blockieren die IF1-, IF2-abhängige Bindung von f-Met-tRNS an die 30S-Untereinheit?
2. Welche Antikörper blockieren die EF-Tu-abhängige Bindung von Phe-tRNS an 70S-Ribosomen bzw. an 30S+50S-Untereinheiten?
3. Zur Erfassung der gesamten Elongation, allerdings mit synthetischer m-RNS (Polyuridylsäure = Poly-U) ohne Initiation (33,46,90) wurden spezifische Antikörper zu einem in vitro Poly-Phenylalanin-synthetisierenden System hinzugegeben.

Da die Grundvoraussetzung für einen inhibierenden Antikörper die Erreichbarkeit der antigenen Determinante am intakten Ribosom ist, bietet das Studium dieser "Gesamtfunktion" auch die Möglichkeit, die Akzessibilität (=Zugänglichkeit) einzelner Proteine zu untersuchen.

Schließlich wurden in der vorliegenden Arbeit die beiden Antibiotika Streptomycin (Sm) und Spectinomycin (Spc) bei ihrer Interaktion mit dem Ribosom untersucht.

Hier sollte festgestellt werden, welche Antikörper bzw. -fragmente die Bindung von Streptomycin bzw. Spectinomycin an die 30S-Untereinheit inhibieren.

Der Wirkungsort des bakteriostatisch wirkenden Aminoglykosids Spectinomycin ist die ribosomale 30S-Untereinheit von E. coli (molares Bindungsverhältnis 1:1) (62). Es ist gelungen, dasjenige 30S-Protein herauszufinden (S5), das bei der Spc-Resistenz einiger Mutanten eine Veränderung aufweist (63)

⁺)RF = release factor

und es ist gelungen, einige Charakteristika in bezug auf den Bindungsort der Droge am Ribosom unter Berücksichtigung desjenigen von Streptomycin zu spezifizieren (64,65).

Auch das Aminoglykosid Streptomycin (Sm) hat seinen Wirkungsort auf der kleinen Untereinheit (66,67). Als Genprodukt für Sm^r und Sm^d wurde das Protein S12 (P10) ermittelt (13,66,68). Bislang sind über 100 Mutanten mit verändertem Sm-Verhalten isoliert worden. Es gibt dabei zwei Typen, die sich wie folgt ableiten: $\text{Str}^r \xleftarrow{\text{S12}} \text{Str}^s \xrightarrow{\text{S12}} \text{Str}^d \xrightarrow{\text{S4,S5}} \text{Str}^i$ (s = sensitiv, d = dependent, i = independent, r = resistent). Die Str^i -Mutanten sind keine echten Revertanten, da sie durch Mutation an anderem Ort (S4, S5) entstehen (69,70,71).

Sm beeinflusst stark negativ die Kopiergenauigkeit (fidelity) der Ribosomen, es verursacht das sogenannte misreading (13,66,72). Man weiß, daß die Proteine S11 und S12 per se die Kopiergenauigkeit der Ribosomen konträr beeinflussen (13,66).

Für die folgenden Untersuchungen wurden generell Antikörper von Kaninchen, selten wurden Antikörper vom Schaf verwendet.

Wird einem höheren Vertebraten (z.B. einem Säugetier) speziessfremdes globuläres Protein injiziert, so bildet das Tier Gegenproteine, die sogenannten Antikörper. Außer Protein kann als Fremdstoff, als Antigen, auch eine Vielzahl anderer Stoffe natürlichen oder synthetischen Ursprungs die Synthese von Antikörpern induzieren. Dieser im einzelnen noch nicht restlos geklärte, komplizierte Vorgang wird als Immunantwort bezeichnet. Je nachdem, ob das Antigen zum ersten Mal, zum zweiten Mal oder zum wiederholten Mal in den Organismus gelangt, bezeichnet man die Immunantwort der Antikörperbildung als Primär-, Sekundär- oder als Hyperimmunantwort.

Es werden in einem Tier Antikörper verschiedener Klassen synthetisiert, die man grob nach ihren Sedimentationskoeffizienten einteilen kann in 19S-Immunglobuline (=IgM), 7S-Immunglobuline (=IgG) und einige andere mit den Bezeichnungen IgA, IgD, IgE, die jedoch z.T. in sehr geringen Mengen vorkommen.

Eine hohe Auflösung dieser Klassen erreicht man immunelektrophoretisch. Die Menge jeder synthetisierten Klasse ist spezifisabhängig. So werden in Kaninchen vorwiegend IgG- und IgM-Antikörper synthetisiert. Jede Klasse kann man wiederum in eine Anzahl Unterklassen nach verschiedenen Gesichtspunkten unterteilen.

Die Antikörper werden in die Blutbahn sezerniert und bilden dort einen wesentlichen Anteil der Serumproteine. Da ein normal aufgezogenes Tier vielerlei Antikörper gegen alle möglichen Krankheitskeime im Laufe seines Lebens produziert, rechnet man bei einer Hyperimmunantwort durch Immunisieren eines Kaninchens mit globulären Proteinen mit ca. 1 - 3 % spezifischen IgG-Antikörpern.

Die uns in dieser Arbeit interessierenden IgG-Antikörper vom Kaninchen bestehen aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Proteinketten (73,74 u.a.). Die leichten Ketten werden durch je eine Disulfidbrücke (Cystein) an die schweren gebunden, während wahrscheinlich zwei dieser Cysteinbrücken die beiden schweren Ketten zusammenhalten. Etliche Wasserstoffbrücken stabilisieren die Form des Moleküls. Zusammen mit intramolekularen Disulfidbrücken sind es etwa 20 - 25 Brücken pro Molekül. Der verblüffendste Befund ist jedoch, daß das Molekül Regionen mit konstanter Aminosäuresequenz neben solchen mit variabler Sequenz aufweist. Die Konstanz bezieht sich auf die Antikörperpopulation eines Individuums. Die variablen Regionen sind die aminoterminalen Enden der vier Ketten. Das Molekulargewicht der Kaninchen-IgG-Antikörper liegt bei 150.000 Dalton.

Man kann enzymatisch mit Papain (73,74) unter reduktiven Bedingungen das bivalente IgG-Molekül in drei etwa gleich große Fragmente zerlegen, nämlich in zwei sogenannte Fab's (antigenbindende Fragmente) und ein Fc (kristallisierbares Fragment). Man konnte zeigen, daß die Fab-Fragmente nichts von der antigenbindenden Aktivität des IgG-Moleküls verloren hatten (74), was heißt, daß jedes Fab eine der beiden Valenzen des IgG-Moleküls trägt, also monovalent ist. Durch enzymatische Abbauprobungen vom Karboxylende der Fab's her ließ sich

der Bindungsbereich im variablen Teil des Fragments lokalisieren. Das Fc hat keine antigenbindende Valenz, es kristallisiert schon bei der Isolierung leicht aus. Die bei der Painspaltung chromatographisch aufgetrennten FabI- und FabII-Fragmente sind natürlich nicht identisch mit dem linken und dem rechten Arm der IgG-Moleküle, da letztere gleiche Ladungen aufweisen. Auch sind Spezifität und Avidität (= Maß für die Vereinigung von Antigen und Antikörper, wird durch die Bindungskonstante der Reaktion charakterisiert) beider Fab-Arme gleich. Sequenzbestimmungen von Immunglobulinen sind bislang von spezifischen Antikörpern nicht gemacht. Dafür wurden pathologische Immunglobuline, sogenannte Myelomproteine verwendet.

Wesentliche Einblicke in die molekulare Struktur von antigenen Determinanten auf Proteinen wurden gewonnen durch a) synthetische Proteinantigene (75,76) und b) das Studium der antigenen Eigenschaften natürlich vorkommender Proteine mit bekannter Sequenz (152).

Eines der wichtigsten Ergebnisse aus den zahlreichen Versuchen ist, daß die Mindestgröße einer Determinante 4 Aminosäuren ausmacht (75,76), allerdings wurden auch wesentlich größere beschrieben (12 Aminosäuren). Weiter ist es wichtig, daß es nicht nur Antikörper gegen Aminosäuresequenzen, sondern auch gegen solche Proteinstrukturen gibt, die sich von der Sekundär-, Tertiär- und eventuell Quarternärstruktur ableiten. Für diese konformationspezifischen Determinanten sind daher auch größere "Sequenzabschnitte" notwendig. Auch ist da noch der Begriff der Individualspezifität zu erwähnen. Er bezeichnet das Phänomen, daß identische Antigene in verschiedenen Individuen einer Spezies nicht zu identischen Immunreaktionen führen. Und schließlich gibt es theoretisch alle Möglichkeiten der Überlappung von Determinanten. Zusätzlich sind für die hier dargestellten Untersuchungen noch folgende Punkte wesentlich: Es gibt unterschiedliche Assoziationskonstanten bei verschiedenen Determinanten des erkennenden Systems des Tieres, also letztlich der spezifischen Antikörper. Die

bisher gemessenen Konstanten überstreichen einen Bereich von $8 \cdot 10^3$ bis $10^9 \text{ l} \cdot \text{Mol}^{-1}$ (77,78,79). Im übrigen ist die Assoziationsreaktion eine der schnellsten der Biochemie und liegt mit $10^8 \text{ l} \cdot \text{Mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ nahe bei dem theoretischen Grenzwert von $10^9 \text{ l} \cdot \text{Mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für diffusionsbegrenzte Reaktionen. Es besteht eine Relation zwischen dem Molekulargewicht eines antigenen Proteins und der Zahl der Determinanten auf diesem Protein (158). Für das Experiment mit intakten Ribosomen muß zusätzlich die Einschränkung gemacht werden, daß hier das Einzelprotein, wenn überhaupt, wahrscheinlich nur mit einem Teil seiner Determinanten an der Oberfläche des Ribosoms erscheint.

Eine ausgezeichnete Zusammenstellung der hier erwähnten immunologischen Fakten findet sich unter (154).

Material und Methoden

Präparation der Ribosomen, der ribosomalen Untereinheiten, der Enzymfraktion, der Initiationsfaktoren IF1, IF2 und des Elongationsfaktors EF-Tu

Zur Gewinnung von Ribosomen und Enzymfraktionen wurden Escherichia coli-Bakterien der Stämme A19, MRE 600, B oder K verwendet. Es wurden sowohl kommerziell erhältliche (Merck, Boehringer) als auch Bakterien aus der Eigenzucht gebraucht. Falls nicht anders angegeben, erfolgten die Experimente mit dem E. coli K12-Stamm A19 (RN'ase I⁻, Met⁻; Gesteland). Die Bakterien wurden im allgemeinen in der späten logarithmischen Phase geerntet; zur Präparation der Faktoren erfolgte die Ernte nach dem ersten Drittel. Aufbrechen der Zellen: (4°C und im Eisbad)

Die frischen oder aufgetauten Zellen (1/3 bis 2/3 log-Phase) wurden mit der doppelten Menge des Nettogewichts Al₂O₃-Pulver (Alcoa A-305, Alcoa Chemicals) im Mörser von Hand oder in einer mechanischen Mühle (Typ RMO, Fa. Retsch, Haan) zu einem dicken Teig angerührt und dann 4 - 6mal 1 Minute lang intensiv zermörsert. Die so aufgebrochenen Zellen suspendierten langsam in TMAI oder Aufarbeitungspuffer. Alle Puffer finden sich im Anhang (Seite 101). ⁴⁾

Zentrifugation des Homogenats im 30 000 g-Schwerefeld:

1. Homogenat zentrifugieren: 30 Minuten bei 30 000 g (Sorvall, Rotor SS 34). Es sedimentieren Alcoa und Zellwandfragmente. Der Überstand wurde mit einer Lösung frisch bereiteter DN'ase (Serva Nr.18550) versetzt (2 µg/ml Überstand), die 10 Minuten lang bei 0°C einwirken konnte. Durch Abbau der Zell-DNS verliert das Homogenat einen Teil seiner Viskosität.
2. Homogenat zentrifugieren: 30 Minuten bei 30 000 g (Sorvall, Rotor SS 34). Der Überstand wird S-30 genannt.

Zentrifugation im starken Schwerfeld (225 000 g):

S-30 zentrifugieren: 4,5 h bei 225 000 g (Beckmann, Rotor 60 Ti). Sediment: Ribosomen, Überstand = S-100 oder auch RF (ribosome free) stellt die weitgehend ribosomfreie Enzym- und Faktorenfraktion dar.

⁴⁾ Sämtliche in Material u. Methoden durch Abkürzungen oder Trivialnamen bezeichneten Puffer finden sich im Anhang Seite 101/102.

Fertigaufarbeiten des S-100

Die Enzymfraktion wurde entweder mit einem zweiten 225000 g-Zentrifugationsschritt in RF- oder TMAI-Puffer (zum Auffüllen der Zentrifugenröhrchen) völlig ribosomenfrei gemacht oder sie wurde mit TMAI-äquilibrierter DEAE-Zellulose (Whatman) verrührt zwecks Konzentrierung der Faktoren und Enzyme und Abtrennung von vorhandenen RN'asen.

Nach Waschen der Ionenaustauscherzellulose mit TMAI wurde die Enzymfraktion mit einem Stufengradienten (TMAI + 0,25 M NH_4Cl) eluiert. Die braune Fraktion wurde bei einer Transmission des Peaks von 4 % geschnitten und enthielt konzentriert und RN'ase-frei die "Überstandsenzyme" und "-faktoren". Auf der Säule bleiben u.ä. die Transferribonukleinsäuren (tRNS), die ebenfalls isoliert werden können. Lagerung: bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff. Beide Methoden und Variationen der Präparationen wurden angewendet, da keine Unterschiede bei den Experimenten auftraten.

Reinigung und Waschen der Ribosomen

Die nach Dekantieren des S-100 verbliebenen Sedimente enthalten die Ribosomen. Diese müssen noch von im Sediment befindlichen Überstandskomponenten gereinigt werden und bei Bedarf von anhaftenden Faktoren durch Waschen mit hohen Salzkonzentrationen befreit werden (11,15,80).

1. Resuspendieren der Ribosomen in TSMI-Puffer mit 0,6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oder TMAI-oder Ribosomen-Puffer: 20 Minuten bei 30 000 g (Sorvall, Rotor SS 34). Im Sediment sind unlösliche Komponenten.

2. Überstand: 4,5 h bei 225 000 g

Dieser Schritt kann zur Reinigung der Ribosomen wiederholt werden. Sollten ribosomale Faktoren, wie Initiations- und Elongationsfaktoren von den Ribosomen gewaschen werden, wurde bei den letzten Zentrifugationen mit Puffern gearbeitet, die eine $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - oder NH_4Cl -Konzentration von 0,5 Mol/l, 0,6 Mol/l oder 1 Mol/l hatten.

Dialyse und Lagerung

Anschließendes Dialysieren gegen Ribosomenpuffer oder TMAI

bei Wahrung einer möglichst hohen Ribosomkonzentration (60 - 100 mg/ml) beendet die Aufarbeitung.

Lagerung der Ribosomen: in aliquots bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff.

Präparation der ribosomalen Untereinheiten

Die Separation der beiden ribosomalen Untereinheiten mittels Zonalzentrifugation ergab zwei scharf getrennte Hauptgipfel, die 50S-Fraktion und die 30S-Fraktion. Die Präparation der Ribosomen erfolgte wie oben beschrieben. Nach Waschen mit 1molar NH_4Cl , Dissoziation der Untereinheiten in Dissoziationspuffer (10 mM K-Phosphat, pH 7,4, 1mM MgCl_2 und 1 mM β -Merkaptoäthanol). Die Trennung der Untereinheiten erfolgte in einem B XV-Zonalrotor in einer MSE-Ultrazentrifuge, der bei 3000 UpM mit 660 mg Ribosomen beschickt wurde und 17 h bei 25 000 UpM lief (81,82). Der Saccharosepuffer zur Auftrennung der Untereinheiten enthielt in 2,5 l: 1 860 ml 60 % (Gew./Vol) Saccharose, 2,5 ml 1 M MgCl_2 , 1,05 ml β -Merkaptoäthanol und 610 ml quartzdestilliertes Wasser. Die Saccharose war mit Bentonit gegen RN'ase behandelt und über Dowex-Ionenaustauscher gegeben, um Schwermetallionen zu entfernen. Die Sedimentation der Untereinheiten erfolgte in einer Ultrazentrifuge (Beckmann, Rotor 60 Ti, 17 h bei 50 000 UpM). Die Sedimente wurden ungelöst in den Röhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren und darin oder bei -80°C gelagert. Sie wurden erst kurz vor dem Versuch in aliquots gelöst.

Präparation der Initiationsfaktoren IF1 und IF2

Die Präparation der Initiationsfaktoren IF1 und IF2 geschah nach der Methode von Hershey et al. und wurde in Zusammenarbeit mit J.C.Lelong durchgeführt (83).

Präparation der rohen Initiationsfaktoren

Die Aufarbeitung bis zu dem S-30 genannten Überstand geschah wie oben beschrieben, jedoch in Puffer A (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 mM Mg-Acetat, 1 mM DTT). Die Ribosomen wurden über ein Glycerinkissen (10 % in Puffer A) sedimentiert.

Ein ebensolches Kissen (10 % Glycerin in Puffer B: 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 500 mM NH_4Cl , 40 mM Mg-Acetat, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) wusch die Faktoren von den Ribosomen. Sie wurden als rohe Initiationsfaktoren durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,4 g/ml) aus dem Überstand präzipitiert.

Reinigung von IF1

Es erfolgten drei Reinigungsschritte

1. Schritt: Phosphozellulose-Säulenchromatographie

Die Beladung der Phosphozellulose-Säule (1,5x42 cm Whatman) mit den rohen Initiationsfaktoren erfolgte in Puffer C mit 0,1 M NH_4Cl (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 % Glycerin). Eluiert wurde in demselben Puffer mit einem linearen Gradienten von 0,1 - 0,8 M NH_4Cl in Puffer C. Die IF1-Aktivität wurde bei 0,4 und 0,55 M NH_4Cl eluiert, die IF2-Aktivität (0,25 M NH_4Cl) wird hier verworfen.

2. Schritt: Konzentration von IF1

Diese Konzentration wurde erreicht durch einen abermaligen Chromatographieschritt mit Phosphozellulose (kleine Säule), die wie die IF1-Fraktion gegen Puffer C mit 0,2 M NH_4Cl äquilibriert war. Auch die Elution erfolgte in Puffer C, aber mit 0,8 M NH_4Cl . 90 % der ursprünglichen Aktivität wurde isoliert.

3. Schritt: G-50-Sephadex Gelfiltration

G-50-Sephadex wurde mit Puffer C (mit 0,2 M NH_4Cl) äquilibriert. Von einer G-50-Sephadexsäule (1,1 x 95 cm) wurde die IF1-Aktivität in der Wärme nach 1,5 Leervolumina eluiert. Die IF1-Fraktion war danach zu ungefähr 95 % rein.

Reinigung von IF2

1. Schritt: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fraktionierung

Die Aufarbeitung geschah wie bei IF1, nur daß hier das Protein bei einer 50 und 35 %igen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration präzipitiert wurde. Das erste Präzipitat wurde verworfen, im zweiten befanden sich jedoch etwa 50 % der ursprünglichen Aktivität.

2. Schritt: Phosphozellulosechromatographie

Dieser Schritt verlief analog dem IF1-Schritt, nur in Puffer D (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) mit 0,1 M NH_4Cl . Der Peak wurde bei 0,25 M NH_4Cl eluiert.

3. Schritt: Konzentration

Auch hier wurde wie bei IF1 verfahren, jedoch mit Puffer D. Elutionspuffer war 0,5 M NH_4Cl in Puffer D.

4. Schritt: Sephadex-G-200-Gelfiltration

Auf eine Sephadex-G-200-Säule (1,75 x 80 cm) wurde die gegen 0,2 M NH_4Cl in Puffer D dialysierte Probe gegeben und IF2 eluierte vor den anderen Proteinen. Es wurden dabei ca. 90 % der Aktivität zurückgewonnen, die Reinheit war größer als 90 %. IF2 enthielt keinerlei IF1- bzw. IF3-Nebenaktivität.

Präparation des Elongationsfaktors EF-T bzw. EF-Tu

Es wurde zur Präparation des Elongationsfaktors EF-T (= EF-Tu + EF-Ts) bzw. EF-Tu die Methode von Ravel und Shorey angewendet (85).

Das Aufbrechen der E. coli-Zellen und die Abtrennung der Ribosomen von dem Überstand (S-100) geschah wie auf Seite 7 beschrieben, nur daß hier folgender Puffer verwendet wurde: 10mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT. Der Überstand war die Quelle der Elongationsfaktoren. Zu 400 ml des Überstandes wurden unter langsamen Rühren 77 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hinzugefügt. Der pH wurde mit 1N KOH auf 7,5 titriert. Nach 20' wurde das Präzipitat durch Zentrifugation bei 30 000 g (30') gesammelt und verworfen. Zu dem Überstand kamen noch einmal 60 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hinzu, worauf das Präzipitat wiederum gesammelt und anschließend in wenig Puffer gelöst wurde (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM DTT). Die Lösung dialysierte über Nacht gegen denselben Puffer. Alle Schritte erfolgten bei 4°C.

Diese Fraktion war die mit EF-T (T-Faktor) bezeichnete Komponente, die EF-Tu, EF-Ts und als Verunreinigung den Translokationsfaktor EF-G enthielt. Immer dann, wenn diese Fraktion im Phe-tRNS-Bindungstest verwendet wurde, erfolgte ein Zusatz von Fusidinsäure, um Translokation durch EF-G zu verhindern.

EF-Tu-Separierung

Um ein klares Bild in bezug auf die Wirkung von EF-G-Faktor im Experiment zu bekommen, wurde EF-Tu separiert. Die Ab-

trennung erfolgte ebenfalls nach Ravel und Shorey (85).

16 ml der obigen Fraktion (50 mg Protein/ml) wurden auf eine KCl-Konzentration von 0,15 M gebracht und auf eine DEAE-Sephadex-A50-Säule (1,5 x 55)cm gegeben, die mit 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM DTT und 0,15 M KCl äquilibriert war. Das Nachwaschen erfolgte mit einem linearen KCl-Gradienten (von 0,15 M bis 0,35 M KCl, 500 ml) in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 und 1 mM DTT. Der Durchfluß betrug 0,25 ml pro Minute und Fraktionen zu je 20 ml wurden gesammelt. Um EF-Tu zu stabilisieren, wurden 0,1 ml einer 0,2 mM GTP, 0,4 M $MgCl_2$ -Lösung zu jedem Röhrchen vor dem Zusammengießen gegeben. Nach Testen der Fraktionen auf EF-Tu-, EF-Ts- und EF-G-Faktor-Aktivität ergab sich folgendes Bild: EF-Ts eluierte bei 0,25 - 0,27 M KCl, gefolgt von EF-Tu bei 0,29 - 0,31 M KCl und EF-G bei 0,32 - 0,33 M KCl.

Die Konzentration der EF-G-reinen EF-Tu-Fraktion erfolgte in einer Diaflo-Modell-50-Ultrafiltrationszelle, die mit einer UM1-Membran ausgestattet war.

Lagerung bei $-80^{\circ}C$ in Gegenwart von 10 mM Mg^{++} und 1 μM GTP.

Präparation der ^{14}C -Phe-t-RNS und der 3H -f-Met-t-RNS

^{14}C -Phe-tRNS

Die enzymatische Synthese von ^{14}C -Phe-t-RNS erfolgte mit der gereinigten S-100-Fraktion (85).

6 ml des Reaktionsgemisches enthielten:

E. coli-t-RNS Schwarz

			20 mg
Tris-HCl, pH 7,4	)	(1M)	0,300 ml
KCl	) (Merck)	(1M)	0,640 ml
β -Mercaptoäthanol	(Serva)		0,005 ml
ATP-K	)	(0,1M)	0,120 ml
PEP	) (Boehringer)	(0,2M)	0,160 ml
S-100 (DEAE 32, Whatman)			1,000 ml
Mg-Acetat	(Merck)	(1M)	0,060 ml
H ₂ O (quarzdestilliert)			3,215 ml
^{14}C -Phe (sp.Act.384 mCi/mM,			
100 nCi/ml, 0,26nMol/ml, pH 7,4)(NEN)			0,500 ml

Das Reaktionsgemisch inkubierte 30' lang bei 37°C. Anschließend erfolgte die Entfernung der Überstandsproteine und -enzyme aus dem Gemisch. Es kamen hinzu: 1,5 ml 1M-Na-Acetat-Puffer, pH 5,0 zur Stabilisierung des ^{14}C -Phe-t-RNS-Komplexes und 7,5 ml wassergesättigtes Phenol, p.A. (Merck). Die Proteine ließen sich mit Phenol innerhalb von 30' in der Kälte ausschütteln und bei 8 000 g (5') mit dem Phenol von der wässrigen Phase abtrennen. Die wässrige Phase wurde ein zweites Mal mit ca. 4 ml Phenol 15' lang ausgeschüttelt und unter denselben Bedingungen noch einmal zentrifugiert. Das Ausfällen der t-RNS erfolgte durch Hinzufügen von 1/10-Volumen NaCl (4M) und 2 Volumina Äthanol, p.A. (-18°C) innerhalb von 2 Stunden. Die t-RNS wurde durch 2' Zentrifugation bei 12 000 g gewonnen. Die Entfernung des Restsalzes geschah durch zweimaliges Waschen des Präzipitats mit Äthanol, p.A. bei -18°C und anschließendes Waschen in Äthyläther, p.A.. Das Sediment wurde in Äther 10' lang bei 12 000 g abzentrifugiert. Nach dem Trocknen sowie Lösen in 2-3 ml 0,01 M-K-Acetat-Puffer, pH 5,0 lagerte die beladene Phe-t-RNS bei -20°C.

Der Grad der Beladung betrug je nach Präparation 70-100 %.

^3H -f-Met-tRNS

Die Präparation der tritierten f-Met-tRNS erfolgte nach einer Methode von Revel et al. (46).

E. coli-Gesamt-tRNS wurde mit ^3H -Methionin (300 $\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$) in Gegenwart von Formyltetrahydrofolat (Katalytische Reduktion von Formylfolat durch H_2) beladen. Es wurde dazu wie bei der Präparation der ^{14}C -Phe-tRNS verfahren und die S 100-Fraktion verwendet. Die beladene tRNS wurde durch Phenolextraktion in 0,01 M Acetatpuffer, pH 5,0 und 0,1 M NaCl extrahiert und mit Alkohol präzipitiert. Abschließend wurde über eine Sephadex G-25-Säule filtriert. Die tRNS war ca. 60 % formyliert.

Immunisieren, Gewinnen der Seren, Präparation der 7S-IgG-Fraktion, Charakterisierung der Seren, Reinheitskriterien, chromatographische Anreicherung der 7S-Antikörper aus Hyperimmunseren sowie enzymatische Spaltung der 7S-Antikörper mit Papain.

Die verwendeten Antiseren kamen in der Regel von Kaninchen, in Sonderfällen von Schafen. Die Immunisierungsprozedur der Kaninchen verlief folgendermaßen:

Nach der Abnahme von Blut am Tage 0, zwecks Herstellung von Nicht-Immunserum (=NIS, Serum vor der Immunisierung), wurden 200 - 500 µg gereinigtes ribosomales Einzelprotein mit Freund's komplettem Adjuvans intracutan und intramuskulär an zehn verschiedenen Stellen des Kaninchenkörpers injiziert. Am Tage 14 erfolgte die Applikation (i.c. und i.m.) von 350 - 700 µg Einzelprotein in Freund's inkomplettem Adjuvans. Am Tage 21 erhielt das Tier auf die gleiche Art und Weise noch einmal 250 - 400 µg Protein.

Die erste Blutentnahme nach der Immunisierung erfolgte am Tage 26. Es wurden wie auch später jeweils ca. 40 ml aus der Ohrvene entnommen. Die weiteren Entnahmen erfolgten in 10 - 14-tägigen Intervallen.

Boosterinjektionen von 250 - 400 µg Protein wurden in Abständen von mindestens 14 Tagen aber im allgemeinen nach Höhe des Globulin-Titers verabfolgt. Eine grobe Titerbestimmung erfolgte nach der Ouchterlony-Methode (86).

Die Aufarbeitung des Blutes nach 24 - 48 Stunden, wobei das geronnene Blut ca. 10' bei 4 000 UpM zentrifugiert wurde. Das im Überstand befindliche Serum konnte bei -20°C gelagert oder sogleich weiterverarbeitet werden.

Die γ -Globulinfraktion wurde mit ca. 1/3-Sättigung an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bei pH 8.0 ausgefällt (1,1 Volumen gesättigte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung + 2 Volumina Serum).

Für die Standardpräparation wurde das γ -Globulin aus 100 ml Serum, die aus nahe beieinanderliegenden Abnahmen mit bekanntem Titer vereinigt worden waren, durch diese $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung vierfach konzentriert. Die resultierenden 25 ml γ -Globulin als Auftragsvolumen wurden auf einer Sepha-

dex G-150-Säule (10 cm $\varnothing$, 120 cm Länge), äquiliibriert in 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,2 M NaCl, aufgetrennt. Es ergab sich in der Regel folgendes Profil:

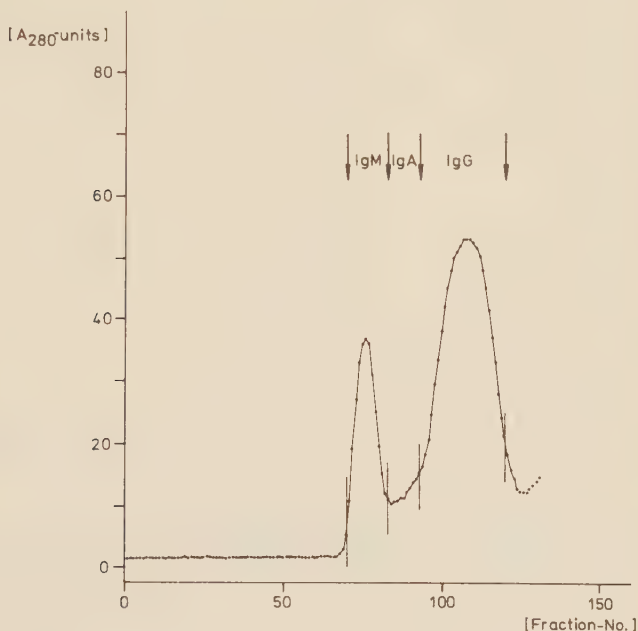


Abb.2 Auftrennung der drei Globulinklassen IgM, IgA und IgG aus der Anti-S13- γ -Globulinfraktion auf Sephadex G-150

Eine ähnliche Auftrennung aus dem kompletten Serum bringt nachfolgendes Profil (Abb.3).

Nach dem Schneiden des 19S (IgM)- und des 7S (IgG)-Peaks wurden diese gegen K-Phosphat-Puffer, pH 8,0 für kurze Zeit dialysiert. Der zwischen beiden liegende IgA-Peak, der unter diesen Bedingungen schlecht aufgelöst erscheint, wurde verworfen.

Nach der Dialyse erfolgte die Einengung des großen Volumens durch Lyophilisation. Anschließend wurde wiederum gelöst und extensiv gegen 0,001 M K-Phosphat, pH 8,0 dialysiert.

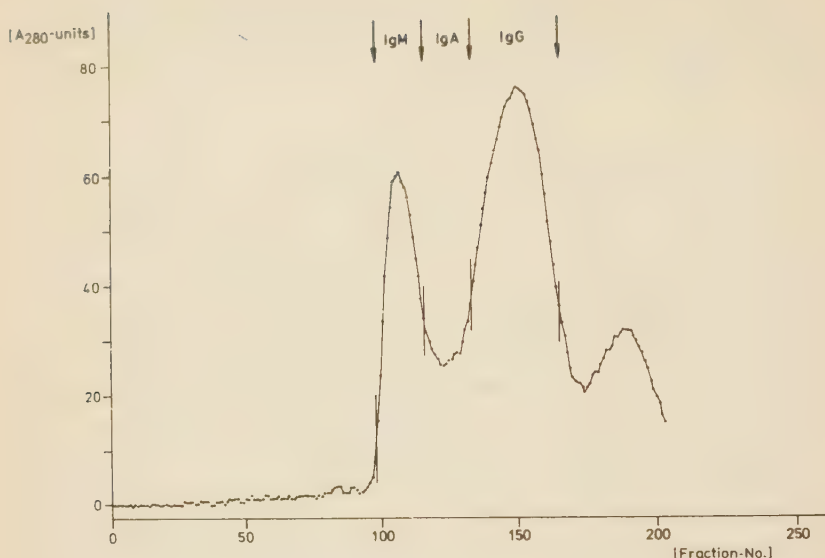


Abb.3 Auftrennung des Anti-S7-Gesamtserums in die IgM-, IgA-, IgG- und Albuminfraktion auf Sephadex G-150

Alle Schritte sowie die Lagerung des am Schluß hergestellten Lyophilisates erfolgten bei 4°C.

Die grobe Titerbestimmung wurde im Ouchterlony-Verfahren (86) im Semimikromaßstab durchgeführt (87). Es wurden Präzipitate von γ -Globulin gegen 7oS-Gesamtprotein (TP 7o = Total Protein 7oS) oder gegen TP 3o entwickelt. Bei 50 μ g TP 7o bzw. 15 μ g TP 3o mit 100 μ l Antiserum entwickelt, befand sich die Präzipitationslinie in Äquivalenz. Es wurden lediglich geringe Schwankungen registriert.

Eine Verunreinigung des Serums mit Anti-5oS-Antikörpern wurde ausgeschlossen, indem 100 μ l Serum gegen 15 μ g TP 3o und 30 μ g TP 5o auf Ouchterlonyplatten entwickelt wurden.

Die Prüfung auf Verunreinigungen mit Antikörpern, die gegen andere 3oS-Proteine als das Antigen gerichtet waren, er-

folgte ebenfalls per Ouchterlonytest. In das zentrale "Loch" einer Ouchterlonyplatte wurden 100 μ l Serum (oder die entsprechende Menge γ -Globulin) gefüllt, in die peripheren Löcher 0,5 - 1,0 μ g jedes Einzelproteins der 3oS-Untereinheit. Als reines Serum gegen ein individuelles Protein der 3oS-Untereinheit wurde nur dasjenige bezeichnet, das keine Reaktion mit TP 50 zeigte und ausschließlich mit dem homologen 3oS-Einzelprotein eine Präzipitationslinie bildete.

Im allgemeinen waren die nach diesen Kriterien geprüften Seren rein. Bei auftretenden Verunreinigungen, die durch unreines Antigen entstehen können, mußte die Verunreinigung weniger als 10 % des spezifischen Titers betragen, um für die Experimente zugelassen zu werden.

Die Charakterisierung der IgG-Fraktionen erfolgte nach der Ouchterlony-Methode und immunoelektrophoretisch mit folgenden Seren:

a) Anti-Gesamt-Kaninchenserum-Serum vom Schaf (Abb.4), b) Anti-7S-IgG-Kaninchenserum-Serum vom Schaf (Abb.5, 7), c) Anti-FabI-Kaninchenserum-Serum vom Schaf (Abb.13), d) Anti-Fc-Kaninchenserum-Serum vom Schaf (Abb.13)

Anreicherung von ladungskonformen 7S-Antikörpern durch Zellulose-Chromatographie.

In dem Bestreben, die IgG-Fraktion noch weiter nach spezifischen und unspezifischen Antikörperfraktionen aufzuteilen, um damit spezifische Antikörper anzureichern, kamen zwei Chromatographieverfahren zur Anwendung.

Im ersten Verfahren wurden auf eine mit 0,02 M K-Phosphat, pH 8,0 äquilibrierte DEAE-32-Zellulosesäule (2 x 30 cm) etwa 600 mg IgG, dialysiert gegen 0,001 M K-Phosphat, pH 8,0, aufgetragen. Dies konnte bei 4°C oder Zimmertemperatur geschehen. Der dadurch entstehende Stufengradient eluierte bei 0,02 M K-Phosphat die Schnitte I und II (Schnitt = cut). Mit einer weiteren Stufe von 0,3 M K-Phosphat, pH 8,0 eluierte der cut III und bei 1,0 M K-Phosphat, pH 8,0 kam nichts mehr von der Säule. Die anschließende Weiterverarbeitung erfolgte bei 4°C wie bei der Aufarbeitung der Globuline (Abb.6).



Abb.4

Immunelektrophorese von Anti-SX-Kaninchen-serum. Bedingungen: 1 % Agarose (Miles Seravac), Veronal-Acetat-Puffer, pH 8,2 (19 mM Na-Veronal). Apparatur: Fa. Desaga, Spannung 100V, Laufzeit 66', Entwicklung gegen Anti-Kaninchen-Serum-Hammelserum. Auftragsmenge: links 5 μ l, Mitte 10 μ l, rechts 5 μ l Serum. Kathode unten.

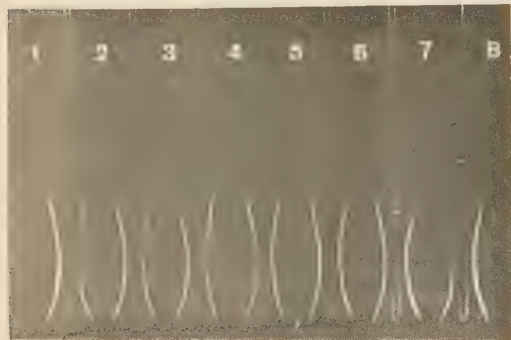


Abb.5

Immunelektrophorese von vier IgG-Präparationen gegen vier verschiedene ribosomale Proteine. Anti-S7 (1,2) Anti-S5 (3,4), Anti-S6 (5,6), Anti-S8 (7,8). Es wurden jeweils 5 μ l u. 10 μ l IgG-Lösung (10 mg/ml) in die Startlöcher gegeben. Zeigten die Fraktionen Verunreinigungen wie in Pos. 4 und 5, so wurde in

der Regel mit gutem Erfolg rechromatographiert. Bedingungen s. Legende Abb. 4. Kathode unten.

Die Reinheit dieser DEAE-cuts sowie die Ladungsabnahme mit steigender Schnittziffer sind immunelektrophoretisch festgehalten. (Abb.7)

Die Ausbeuten der cuts I, II, III waren jeweils relativ konstant bei 80 - 90 %.

Bei der weiteren Anreicherung eines DEAE-cuts der 7S-Antikörper durch CM 32-Zellulose (Carboxymethylzellulose) (Whatman) erfolgte die Prozedur bei Zimmertemperatur, da sonst die Antikörper in dem angewendeten pH-Bereich ausfielen. Auf eine mit 0,001 M K-Phosphat, pH 6,7 äquilibrierte CM 32-Säule (2 x 20 cm) wurde die gegen denselben Puffer dialysierte Probe (600 mg) aufgetragen. Ein 250-250 ml-Gradient von 0,1 M

bis 0,4 M K-Phosphat, pH 6,7 eluierte mit folgendem Profil:
(Abb.8)

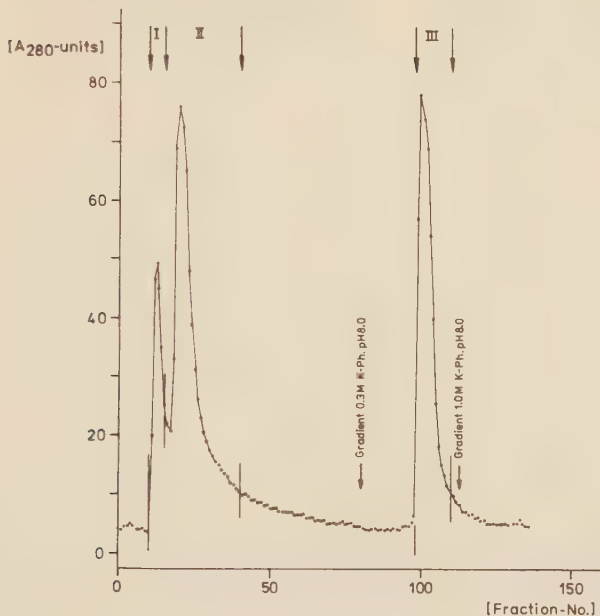


Abb.6

Anreicherung ladungskonformer 7S-Antikörper auf DEAE-32-Zellulose. Auftragspuffer: 0,02 M K-Phosphat, pH 8,0. Erläuterungen s. Text.

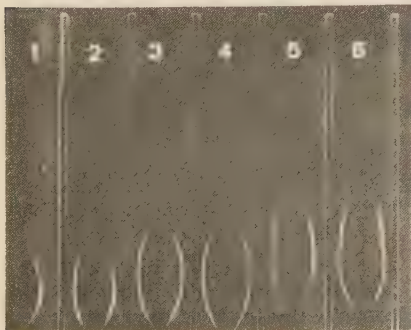
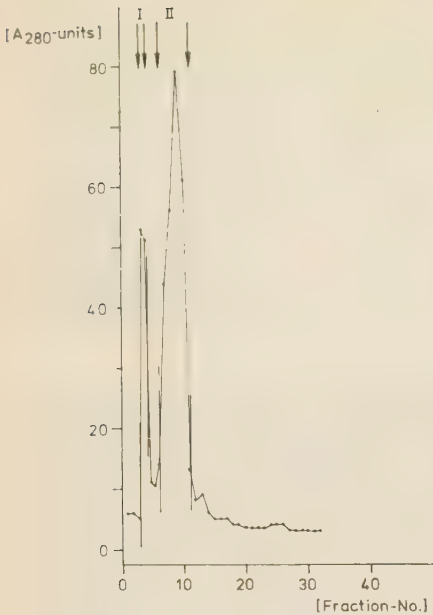


Abb.7

Immunelektrophorese der IgG-DEAE-Schnitte I (1,2), II (3,4), III (5,6) von Anti-S7. Es wurden jeweils 5 und 10 µl einer 10 mg/ml-Lösung in die Startlöcher gegeben. Inhomogene Schnitte (5,6) wurden rechromatographiert oder von den Experimenten ausgeschlossen. Bedingungen siehe Legende Abb.4. Kathode unten.

Abb.8

Anreicherung ladungskonformer 7S-Antikörper aus dem DEAE-Schnitt I auf Carboxymethylzellulose. Bedingungen im Text.



Anschließend erfolgte die Schlußdialyse bei 4°C gegen 0,001 M K-Phosphat, pH 8,0.

Es entstanden so jeweils zwischen 2 - 3 CM-Peaks pro DEAE-cut, was darauf hindeutet, daß durch das zweite Verfahren Überlappungen aufgetrennt werden. Es sind also aus einem Serum bis zu 7 (schneidbare) verwertbare Schnitte zu erhalten, was ein hohes Maß an präparativer Auflösung bedeutet.

Die Ausbeuten bei der CM-Chromatographie der DEAE-Schnitte lagen bei ca. 80 %.

Es wurden ebenfalls IgG-Fragmente (FabI, Abb.10) nochmals auf DEAE-Zellulose (s.S.27) geladen, um zu sehen, ob auch hier noch eine Auftrennung erfolgt. Wie man in Abb.9 erkennt, sind in der Regel zwei Gipfel zu erkennen, mit I und II bezeichnet.

Die Papainspaltung von DEAE-cuts erbrachte auf C M 32 die normale Auftrennung in FabI, II und Fc (Abb.10). Lediglich FabII eluierte statt bei 0,14 M bei 0,095 M Na-Acetat. Deut-

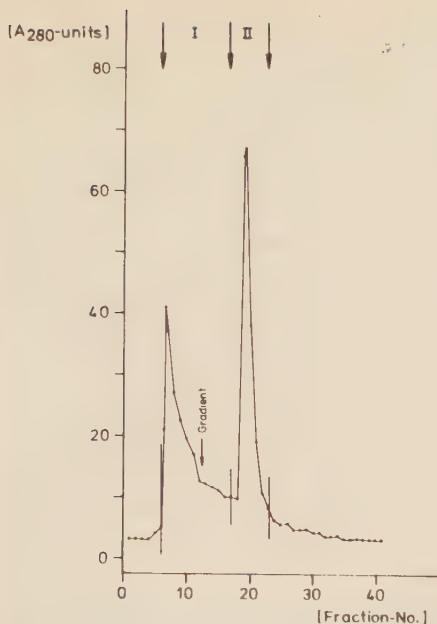


Abb.9

Chromatographische Auftrennung der FabI-Fraktion auf DEAE-Zellulose. Bedingungen wie im Text bei Abb. 4

lich sieht man beim DEAE-Schnitt II den zum cut III relativ hohen Anteil FabII und Fc, was darauf zurückzuführen ist, daß der DEAE-cut II saurer ist als der cut III (Abb.6). Der DEAE-cut III wird also anteilig mehr basische FabI enthalten als der cut II.

Enzymatische Spaltung der 7S-IgG-Fraktion mit Papain

IgG-Fragmente wurden nach einer etwas abgewandelten Methode von Porter (73) in der Wärme präpariert. Wahrscheinlicher Reaktionsmechanismus: es wird unter reduktiven Bedingungen eine Disulfidbrücke der Hinge-Region reduktiv und die zweite enzymatisch gespalten (88).

Die Prozedur war folgende: (Angaben für 200 mg Protein nach Messung der Extinktion $E_{280\text{ m}\mu}$ bei Annahme einer spezifischen Extinktion einer 1 %igen Lösung und 1 cm Schichtdicke von $E_{280\text{ m}\mu} = 12,5$).

200 mg spezifisches Anti-SX-IgG-Lyophilisat (X steht für ein beliebiges ribosomales Protein) werden in 15,2 ml 0,1 M

Na-Acetat-Puffer, pH 5,6, 15' bei 37°C vorinkubiert. Nach Hinzufügen von 2 ml 0,02 M EDTA, pH 5,6 (Äthylendiamintetraessigsäure = Titriplex III), um die anfallenden Schwermetallionen (Hg) wegzufangen und 2 ml 0,1 M Cysteinlösung, pH 5,6, um reduktive Bedingungen zu schaffen, erfolgte der Zusatz von Quecksilberpapain (HGPAP, Worthington) in einem Gewichtsverhältnis Papain : Protein von 1 : 100.

30 % der IgG-Moleküle sind nach 15' bereits gespalten (74), jedoch erfolgte die Inkubation zur quantitativen Ausbeute bei 37°C über 16 Stunden unter Toluolsättigung gegen Bakterienbefall (0,0065 M Uvasol-Toluol, Merck). Die Reaktion wurde gestoppt durch Hinzufügen von PCMB (p-Chloro-mercuri-benzoat: Schuchardt) bis zu einer Endkonzentration von 0,002 Mol/l. Es erfolgte anschließend eine Dialyse gegen den Startpuffer (0,01 M Na-Acetat, pH 5,6) der CM-Säule (Carboxymethylzellulose, Whatman), die 24 Stunden bei 4-maligem oder kontinuierlichem Pufferwechsel von insgesamt 8 - 10 Litern unter Toluol in der Wärme durchgeführt wurde.

Die Chromatographie (Säule 2,4 x 30 cm) ergab ein jeweils typisches Profil, wie es in Abb.10 dargestellt ist.

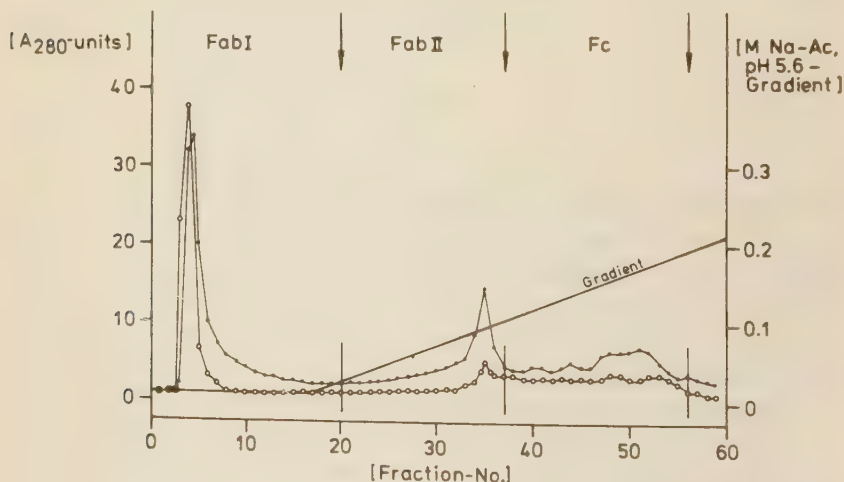


Abb.10 Carboxymethylzellulose-Auftrennung der Spaltprodukte zweier Papainspaltungen. ●—● Anti-S3-IgG DEAE-Schnitt II, ○—○ Anti-S3-IgG DEAE-Schnitt III. (siehe auch Seite 45)

Geschnitten wurden die mit FabI, FabII und Fc bezeichneten Fraktionen. Die nach Vereinigung der Fraktionen gemessene Extinktion $E_{280 \text{ m}\mu}/\text{ml}$ ergab Ausbeuten zwischen 60 und 100 %, je nachdem, ob weniger oder mehr Material als 200 mg IgG gespalten wurde. Die Lyophilisate FabI, FabII und Fc wurden anschließend bei 4°C gegen 0,001 M K-Phosphat-Puffer, pH 8,0 dialysiert (ohne Toluol). Nach abermaligem Lyophilisieren erfolgte die Lagerung bei 4°C.

Reinheitskriterien für die Fragmente

Es kamen verschiedene Methoden als Reinheitstests der drei Fraktionen zur Anwendung: 1. Zelluloseacetatgelelektrophorese (CAG, Beckmann)(Abb.12) mit verschiedenen Puffern, 2. Immunelektrophorese, (Abb.13), 3. Agardoppeldiffusion (86; Abb.11). Alle drei Methoden ergaben, daß die FabI-Fraktion reine IgG-Fragmente enthielt und zwar ohne Verunreinigung von Fc. Fc inhibiert die PolyU-abhängige Poly-Phe-Synthese. FabII und Fc waren gegenseitig verunreinigt, so daß FabII mit ca. 10 % Fc von den Experimenten ausgeschlossen bleiben mußte.

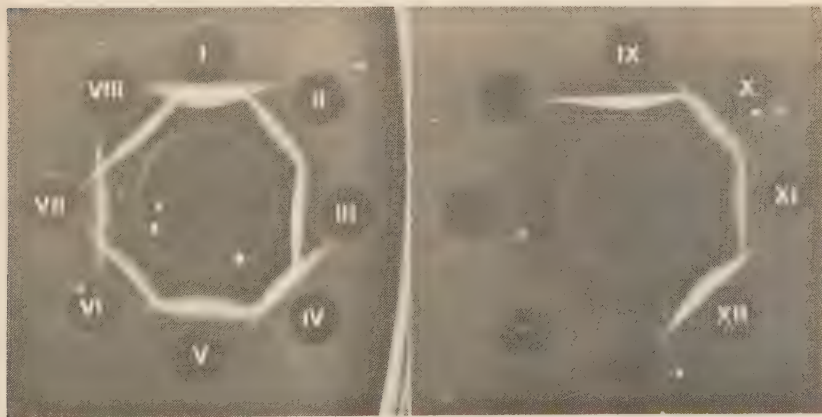


Abb.11

Agar-Doppeldiffusion nach Ouchterlony der Anti-S11-IgG-Spaltungsfragmente. Agarosekonzentration 1,5%; Puffer: 30 mM K-Phosphat, pH 8,0, 0,9% NaCl, 0,002% Cialit. Die Proben wurden in dem selben Puffer in äquivalenten Mengen zu je 5 μl in die Löcher I - XII eingeracht (FabI 1,25 μg , alle anderen 2,5 μg). Die Ouchterlony wurden gegen Anti-Kaninchen-IgG-Schafserum (Zentrum) entwickelt. Die Positionen enthalten: IgG (I, IV, XII), FabI (II, VI), FabII_v (III, VIII, IX), FabII (V, X), Fc (VII, XI), v=Vorgipfel, d.h. der erste Teil des FabII, der unmittelbar vor dem steilen Anstieg des Gipfels geschnitten wurde. (s. auch Seite 45/46 und Abb.10)

Zelluloseacetat-Gelelektrophorese (CAG)
von Serum, IgG, FabI, FabII und Fc

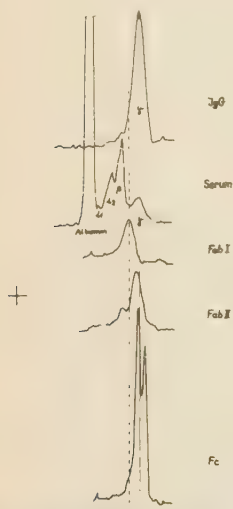


Abb. 12

Optische Densitometerauflösung einer CAG-Elektrophorese. Auf CAG-Folien der Fa. Chemetron (Milano) wurden in einer Beckmann-Apparatur NIS-Serum, (0,5 µl), Anti-S11-IgG (10 µg), -FabI (20 µg), -FabII (20 µg) und -Fc (20 µg) aufgetragen. Veronal-Acetat-Puffer: 57 mM Na-Veronal, pH 8,7; Spannung 200 V; Laufzeit 54'. Färbung 5' 0,5 % Amidoschwarz (Serva) in Methanol-Eisessig (9+1). Entfärbung: Methanol-Eisessig (9+1) und Methanol-Eisessig-Glycerin. Die Folien wurden klar getrocknet densitometrisch abgetastet (siehe auch Seite 46).



Abb. 13

Immunelektrophorese von Anti-S3-FabI (links) und Anti-S3-Fc (rechts). Eine Kontamination von FabI mit Fc ist nicht zu sehen. Bedingungen siehe Legende Abb. 4. (siehe auch Seite 46)

Da infolge heteropolarer Komplexbildung zwischen im großen und ganzen basischen ribosomalen Proteinen und den sauren Fc-Fragmenten unspezifische Effekte erwartet und nachgewiesen wurden, erwies sich nur das FabI für diese Versuche als geeignet. Im weiteren Verlauf der Arbeit gilt hier die Bezeichnung "Fab" als Synonym für FabI. Ein Quecksilbernachweis als $\text{Cu}_2\text{Hg} \cdot \text{J}_4$ mit einer Empfindlichkeit von 0,003 µg Hg/0,03 ml (0,1 %) blieb negativ (166).

Messung der Poly-U-abhängigen Poly-Phe-Synthese

Das zellfreie E. coli-System enthielt in je 100 µl Reaktionsgemisch:

1,74	µMol Mg-Acetat	)	
2,8	µMol Tris-HCl, pH 7,6	)	(Merck)
5,0	µMol $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	)	
19,2	od. 9,6 pMol 70S Ribosomen		
40,0	µg Polyuridylsäure	)	
0,032	µMol GTP-Na	)	
0,5	µMol PEP	)	(Boehringer)
0,072	µMol ATP-Na	)	
0,4	µl Pyruvatkinase	)	
0,1	mg tRNA (Schwarz)		
20,0	µl S-100 (DEAE)		
0,12	µMol β-Merkaptoäthanol (Serva)		
0,334	µMol ^{14}C -Phenylalanin (Sp.Akt.: 375 mCi/mMol (NEN))		
0,334	µMol Phenylalanin (MANN)		

Alle Lösungen in aqua bidest. Die Pipettierreihenfolge war:

1. Mix I = Salz-Mix (Mg-Acetat, Tris-HCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)
oder gegen den Salz-Mix dialysierten Antikörper.
2. Mix II = Energie-Mix (GTP, PEP, ATP, Pyruvatkinase, Poly-U) in H_2O .
3. "S-100" (S-100, tRNA) in RF-Puffer
4. Ribosomen in Ribosomen-Puffer
5. ^{14}C -Phe + Phe in H_2O

Das System wurde optimiert für alle Komponenten, nur die Ribosomen waren limitierend.

Das zellfreie System wurde 1 Stunde lang bei 35°C im Schüttelbad inkubiert, wobei aliquots von 10 µl, angefangen bei 0' (aus dem Eisbad) alle 10' oder in anderen Abständen auf Glasfilter (Schleicher u. Schüll) pipettiert und in eiskalter 10 %iger TCA (Trichloressigsäure) präzipitiert wurden. Diese Glasfilter wurden in einen Teflonkontainer mit separierten Einzelschlitzen eingebracht und dieser für 10' in ein 90°C-5%-TCA-Hydrolysebad überstellt. Das Freiwaschen der Filter von radioaktivem Phenylalanin sowie das Trocknen derselben erfolgte in einer Waschreihe, die der Teflonkontainer mit

den Filtern durchlief. Je eine Minute lang wurde gewaschen mit: 2 x 5 %-TCA, 2 x Äthanol: Äthyläther = 1:1, 2 x Äthyläther. Nach Trocknen der Filter kamen sie in einzelne Meßröhrchen. Mittels 0,5 ml Soluene (Packard) wurde das Präzipitat vom Filter gelöst. Zur Zählung in den 3-Kanal-Flüssigkeitszintillations-Spektrometern Mark I (Nuklear-Chicago) und Tricarb (Packard) wurden 10 ml der üblichen Szintillationslösung (0,4 g POPOP, 7g PPO (Packard) pro 1 Toluol) zu den Proben gegeben. Die Zählausbeute der Szintillationszähler lag beim ^{14}C -Spektrum bei 82 - 87 %.

Messung der enzymatischen Bindung von Phe-tRNS und f-Met-tRNS an das Ribosom

Phe-tRNS-Bindung

Das Reaktionsgemisch von 100 μl enthielt:

Tris-HCl, pH 7,8)	5,0	μMol
Mg-Acetat) (Merck)	0,8	μMol
NH_4Cl)	8,0	μMol
B-Merkaptoäthanol (Serva)	0,7	μMol
30S-Ribosomen	10	pMol
50S-Ribosomen	10	pMol (oder 70S-Ribosomen 10 pMol)
Elongationsfaktor T (EFT)	5	μMol (bzw. EF Tu)
Fusidinsäure ⁺)	1,4	nMol
GTP-Na (Boehringer)	0,07	μMol
Poly-U (Boehringer)	50	μg
^{14}C -Phe-tRNS (^{14}C -Phe, NEN)	2	bzw. 4 A_{260} (40 000 cpm)

Die Pipettierreihenfolge war: H_2O bidest, 1/2 TMN8-Puffer, pH 7,8, in 1/2 TMN8 gelöste Antikörperfragmente, 30S- (oder 70S-Ribosomen). EFT (EFTu), Fusidinsäure, GTP, 50S-Ribosomen, Poly-U, ^{14}C -Phe-tRNS.

Das System war gesättigt für ^{14}C -Phe-tRNS und Poly-U sowie optimiert für die Salze, Fusidinsäure, GTP und EFT bzw. EFTu. Durch die Fusidinsäure wurde in der Kinetik der Phe-tRNS-Bindung ein Plateau nach 15' erreicht. Die Ribosomen waren limitierend.

Es wurde für jedes Fab eine Konzentrationsreihe hergestellt und getestet. Die Inkubationszeit betrug bei 25°C im

⁺) Fusidinsäure wurde freundlicherweise von Miss Barbara Stearns zur Verfügung gestellt.

Schüttelbad 20', danach wurden die Teströhrchen im Eisbad abgekühlt und mit insgesamt 15 ml 1/10 TMN8-Puffer über Millipore-Filter (HAWP 0,45 μ) gefiltert. Nach Trocknen der Filter mit Rotlicht erfolgte die Zählung wie im in vitro Poly-U-Poly-Phe-System. Es wurden jeweils zwei Kontrollen ohne Antikörper und eine Kontrolle ohne 30S- bzw. 70S-Ribosomen mitgetestet. Kontrollexperimente zeigten, daß unter diesen Bedingungen die Phe-tRNS-Bindung durch $5 \cdot 10^{-4}$ Mol Tetracyclin zu 100 % inhibiert wurde.

Additionsversuche mit drei verschiedenen Antikörpern wurden so unternommen, daß statt im Standardexperiment eine Konzentrationsreihe mit einem Antikörper zu testen, eine Konzentrationsreihe mit 1/2 Antikörper A + 1/2 Antikörper B bzw. 1/3 AK A, 1/3 AK B und 1/3 AK C getestet wurde.

f-Met-tRNS-Bindung

Das Reaktionsgemisch von 50 μ l enthielt:

Tris HCl, pH 7,8	)	2,5 μ Mol
Mg-Acetat	) (Merck)	0,4 μ Mol
NH ₄ Cl	)	4,0 μ Mol
β -Merkaptoäthanol (Serva)		0,35 μ Mol
GTP	(Boehringer)	0,03 μ Mol
30S-Ribosomen		16,8 pMol
IF1 (Phosphozellulose, 59)		1,5 μ g
IF2 (rein)		1,3 μ g
Poly-AUG (Miles)		1,12 A ₂₆₀

³H-f-Met-tRNS (unfraktioniert) (NEN) 2,5 A₂₆₀ ($\hat{=}$ 22 pMol)
(17 600 cpm, 800 cpm $\hat{=}$ 1 pMol, Zählausbeute 40 %)

Es wurden pipettiert: 10 μ l H₂O (bidest), 10 μ l 1/2 TMN8-Puffer (oder in demselben Puffer gelöste Fab's), 10 μ l 10^{-2} M GTP, pH 7,0, 7 μ l Poly-AUG, 5 μ l 30S-Untereinheiten, 10 μ l IF-Mix, 4 μ l ³H-f-Met-tRNS. Die Ribosomen waren limitierend, alle anderen Komponenten waren optimiert. Die Inkubation fand 10' bei 25°C statt. Die Fab's wurden in einer Konzentrationsreihe zugegeben, wobei molare Verhältnisse wie bei den Phe-tRNS-Bindungsexperimenten eingehalten wurden. Die Inkubationsansätze wurden über Millipore (HAWP 0,45 μ) filtriert und mit 1/10 TMN8-Puffer (0°C) gewaschen. Die übrige Prozedur war die gleiche wie bei Phe-tRNS beschrieben.

Messung der Bindung der beiden Antibiotika Spectinomycin (Spc) und Streptomycin (Sm) an das Ribosom ⁺

Die Bindungsexperimente für Spectinomycin und Streptomycin erfolgten in einem Reaktionsvolumen von 50 μ l in TMAI-Puffer. Die beiden Antibiotika waren tritiert und lagen als di-³H-Spc und di-³H-Sm vor, sie wurden in einem molaren Verhältnis Spc:Rib bzw. Sm:Rib von 21,6:1 bzw. 14,8:1 hinzugegeben und hatten folgende spezifische Aktivitäten: di-³H-Spc: ~240 mCi/mMol, di-³H-Sm: 750 u. 3000 mCi/mMol.

Die Ribosomen hatten eine Konzentration von 3 A₂₆₀ 70S/Test = 69,5 pMol bzw. 1 A₂₆₀ 30S/Testansatz = 69,5 pMol. Das größte Verhältnis Antikörperfragmente (Fab) : Ribosomen betrug 240:1

Die Ribosomen inkubierten in TMAI-Puffer bei 40°C 30' lang vor und kamen danach auf Eis. Hinzugefügt wurden TMAI-Puffer und zur Zeit 0' di-³H-Spc bzw. di-³H-Sm (0,5 - 1,0 μ g pro Experiment). Die jeweilige Bindungskinetik der Antibiotika ergab die erforderliche Inkubationsdauer von 20 - 35 Minuten.

Die Inhibition der Bindung Antibiotika-Ribosom wurde durch Hinzufügen der proteinspezifischen FabI-Fragmente 5' vor Zugabe von di-³H-Spc bzw. di-³H-Sm erreicht, wobei es gleichgültig war, ob der Antikörper bei 0°C oder bei 35°C binden konnte.

Durch Hinzufügen von 2 ml eiskaltem TMAI-Puffer zum Reaktionsgemisch und sofortigem Filtern desselben über Millipore-Filter (0,45 μ) sowie gründlichem Nachwaschen mit jeweils drei gleichen Volumina TMAI wurde die Reaktion beendet. Das Trocknen der Filter erfolgte unter Rotlicht, die Zählung mit 10 ml Toluolszintillator wie schon vorher beschrieben. Zu jedem Experiment wurden mindestens zwei Kontrollen ohne Antikörper sowie mind. zwei Blindwerte ohne Ribosomen hinzugefügt.

Bindung von Spectinomycin an Fab-Fragmente

Die Inkubationsbedingungen von Fab-Fragmenten und di-³H-Spc waren dieselben wie vorher beschrieben. Das Reaktionsvolumen betrug 125 μ l. Die Konzentrationen waren: FabI (Anti-S 15, Kaninchen 146_I): 10 A₂₈₀ (= 166 nMol), di-³H-Spc: 13 μ l (= 1,245 μ g). Inkubiert wurde 20' bei 35°C, anschließend erfolgte die Beladung einer TMAI-äquilibrierten G50-Sephadex-

⁺) Die beiden tritierten Antibiotika wurden von Dr.A.Bollen zur Verfügung gestellt.

Säule (1x50 cm) bei 4°C. Elutionsaliquots von 2,5 ml wurden gesammelt und anschließend im Spectralphotometer (PQ3, Zeiss) bei 280 mμ gemessen. Eine zweite Messung der Proben erfolgte mit Instagel (Packard) (1 ml + 9 ml Instagel) in einem Tri-carb (Packard) mit automatischer externer Standardisierung, die über alle Messungen konstant blieb. Der durch die optische Extinktion gemessene Proteinpeak und der radioaktive Peak wurden in einem Koordinatensystem aufgetragen.

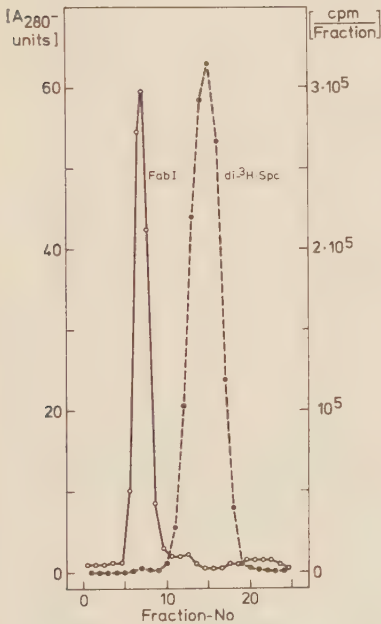


Abb. 14

Kontrolle der Verureinigung von FabI mit tritiierten Spectinomycin. Unter den im Text angegebenen Bedingungen fand sich keine Kontamination.

Ergebnisse

Beeinflussung der Poly-U-abhängigen Poly-Phe-Synthese durch spezifische 7S-Antikörper und deren monovalente Fragmente

Eine Möglichkeit, etwas über die Funktion des Ribosoms herauszubekommen, ist die Störung der Elongationsprozesse während der Proteinbiosynthese mittels spezifischer Antikörper. Nun ist aber die bakterielle Proteinbiosynthese bei E. coli ein sehr komplexer Funktionsmechanismus, der einigen Aufwand für seinen Ablauf erfordert. Das Bestreben geht deshalb dahin, diesen komplizierten Ablauf in Einzelschritte oder Teilabläufe zu zerlegen, um diese mit weniger Aufwand zu untersuchen. Zwei wichtige Entdeckungen waren es, die dies auf einem Gebiete, nämlich der Elongation, ermöglichten: Zum ersten fand man heraus, daß bei einer Mg^{++} -Konzentration von etwa $10^{-2}M$ kein spezieller Proteinketteninitiator (Initiationsfaktor) gebraucht wird (was bei niedriger Mg^{++} -Konz. absolut notwendig ist). Es kann in diesem Fall Phe-tRNS als Starter der Kette fungieren (33,89). Zum zweiten entdeckten Nirenberg und Matthaei (90), daß Polyuridylsäure als m-RNS (91) für die Synthese von Polyphenylalanin dienen kann. Dieses synthetische Polymer führt also in vitro zu einem uniformen Polypeptid. Ein weiterer wichtiger Punkt bei diesem System ist, daß die Schlußphase (=Termination) nicht wie in vitro durch ein amber-Kodon codiert wird, sondern bis zur Erschöpfung des Phe-tRNS-Vorrats fortschreitet. Dabei lassen die Ribosomen das fertige Polypeptid nicht frei, sie laufen auf (31).

7S-Antikörper, spezifisch gerichtet gegen jeweils eines der nicht kreuzreagierenden 21 verschiedenen Proteine der 30S-Untereinheit, wurden in das zellfreie System gegeben. Folgende Ergebnisse könnten sich zeigen: 1. Es wird keine Proteinsynthese gemessen, 2. es wird die volle Proteinbiosynthese gemessen und 3. es gibt Werte zwischen den beiden Extremen.

Zu 1.: Keine Proteinsynthese gemessen könnte heißen: Im Ribosom liegt das Protein SX so, daß es wenigstens eine antigene Determinante an der Oberfläche des Ribosoms hat. SX bezeichnet ein beliebiges 30S-Protein des Ribosoms. Daher kann der oder die spezifischen Antikörper an die Determinante(n) binden. Das Ribosom ist nicht mehr funktionsfähig, da

der Antikörper die Bindung einer funktionsnotwendigen, nicht ribosomalen Komponente, wie mRNS, tRNS, Elongationsfaktoren verhindert.

Zu 2.: Das Protein SX sitzt so im Ribosom, daß keine Determinante von außen zugänglich ist. Kein Antikörper kann angreifen, keine Funktionsstörung findet statt.

Oder: Das Protein SX ist zwar auch an der Oberfläche, aber nicht für den spezifischen Antikörper erreichbar, sei es, daß die antigene Determinante in einer Höhlung liegt und der Antikörper zu groß ist, um anzugreifen, sei es, daß die Determinante teilweise verdeckt ist; der Antikörper muß mindestens 4 Aminosäuren erkennen können (92). Es wäre auch möglich, daß zwar das Protein Determinanten exponiert hat, aber sie liegen nun im Ribosom in ganz anderer Konfiguration als als Antigen im Tier vor. Auch hier kann der Antikörper nicht angreifen.

Zu 3.: Hier wäre es möglich, daß trotz gebundener Antikörper das Ribosom mehr oder weniger effizient arbeiten kann, was möglicherweise davon abhängt, wie weit entfernt sich der Antikörper von einer funktionsnotwendigen Stelle (site) befindet.

Aus diesen Punkten klingt deutlich an, daß es erstrebenswert ist, möglichst kleine Antikörper zu produzieren. Da das auf natürliche Art und Weise nicht zu bewerkstelligen ist, wurden nach einer Methode von Porter (s. Material und Methoden) die Antikörper enzymatisch so gespalten, daß bei voller Funktionsfähigkeit das Antikörperfragment nur noch $1/3$ des Gesamtmoleküls ausmacht. Über die Möglichkeit der Dimerenbildung, die hier nicht erwünscht ist, wird auf den Seiten 14,88 und 43 eingegangen. Diese Antikörperfragmente, Fab genannt, wurden bei den Experimenten verwendet.

Noch ein weiterer Grund führte dazu, Fragmente statt kompletter IgG-Moleküle zu verwenden: Die ribosomalen Proteine sind alle mehr oder weniger basisch (s. Einleitung), der Fc-Teil eines IgG-Moleküls ist sehr sauer (Abb. 10). Um eine unspezifische Interaktion zwischen dem IgG- Fc und ribosomalem Protein zu vermeiden, würde sich daher die Fab-Fraktion als Mittel der Wahl anbieten. Kontrollversuche ergaben, daß das Fc im kompletten IgG-Molekül-Verband keine Tendenzen zu haben

scheint, mit ribosomalen Proteinen unspezifisch zu reagieren, daß jedoch isoliertes Fc oder Fc in der FabII-Fraktion (Abb.11) stark mit den ribosomalen Proteinen reagiert.

Optimierung des Systems für das spezielle Problem

Neben der Optimierung des in vitro-Systems spielt die optimale Einstellung in bezug auf die Antikörper eine entscheidende Rolle. Für die Berechnung von Konzentrationen wurden für Kaninchen-Antikörper folgende Daten zugrunde gelegt: Molekulargewicht: IgG = 150 000, FabI = 50 000, Absorption einer 1 %igen Lösung, bei 1 cm Schichtdicke und einer Wellenlänge von 280 mμ: $E_{280 \text{ m}\mu}$ -IgG = 12,5, $E_{280 \text{ m}\mu}$ -FabI = 12,0.

Die Einwaage der Antikörper enthielt z.T. das Phosphat der Schlußdialyse, das durch Vergleich mit gegen MixI dialysierten Proben keinen Einfluß auf das System erkennen ließ. Die Konzentration pro Test war maximal 75 nMol K-Phosphat.

Die 7S-Antikörper oder deren Fragmente wurden in vielen Fällen in MixI gelöst und gegen denselben Puffer bei Zimmertemperatur 16 h lang dialysiert. Das Lösen in hoher Salzkonzentration in Abwesenheit von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ergab die besten Löslichkeitsbedingungen. Auch war das Lösen in fast jeder beliebigen Konzentration möglich, so daß das Salz den Test nicht störte. Nichtlösliche Bestandteile wurden 2' bei ca. 14 000 g in einer Microfuge (Beckmann) abzentrifugiert.

Die höchste Antikörperkonzentration, die in ein Experiment gegeben wurde, ergab sich in der Regel aus dem Wert, der das Inhibitionsplateau erreichte. Sie betrug im Poly-U-System 250 oder 500 FabI pro Ribosom, in Abhängigkeit von der Aktivität der jeweiligen Ribosompräparation. Da funktionsinaktive Ribosomen spezifische Antikörper in gleicher Weise binden wie aktive Ribosomen, benötigt man zur Inhibition relativ inaktiver Ribosomen einen höheren molaren Anteil an Fab oder IgG.

Die Verzögerungsphase der Inhibitionskurven kann als ein relatives Maß für die Aktivität der Ribosomenpräparation angesehen werden

Der Wirkungsgrad des Poly-U-abhängigen Poly-Phe-Systems lag im Mittel bei 23 Säureamidbindungen pro Ribosom. Das zellfreie System wurde aus experimentellen Gründen vergleichs-

weise auch in einem 10fachen Volumen getestet, wobei sich keine Unterschiede zu dem 100 μ l-System ergaben.

Abgrenzung von spezifischen und unspezifischen Effekten

Wie auch sonst überall, so gilt auch hier die Regel, daß nur positive Ergebnisse eine eindeutige Antwort auf das Experiment geben. Die Abgrenzung, was positiv und was negativ ist, erfolgte durch den Vergleich von IgG's aus spezifischen Antiseren mit Nicht-Immunseren (NIS). NIS wurde den einzelnen Tieren vor Immunisierungsbeginn abgenommen. Im Poly-U-System wurden eine Reihe von Nicht-Immunsera untersucht, sie alle zeigten eine maximale unspezifische Inhibition von ca. 20 %. Dieser Effekt muß als Hintergrund für alle übrigen Seren gelten. Auch bei Zugabe von anderen Proteinen (z.B. Albumin) ließ sich eine ähnliche unspezifische Inhibition reproduzieren. Offensichtlich haben Proteine im allgemeinen einen unspezifischen Effekt auf das Poly-U-abhängige Poly-Phe-System.

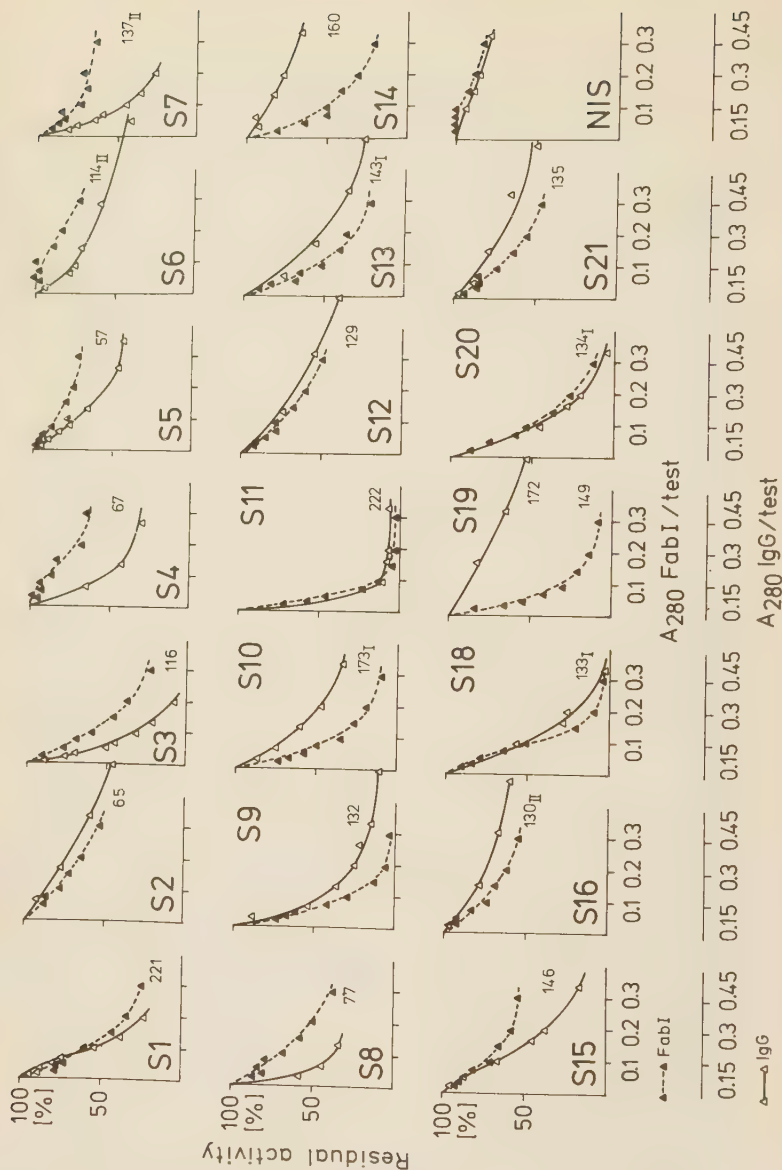
Vergleich der Wirkungen von spezifischen 7S-Antikörpern (IgG) und deren monovalenten Fragmenten

Bei der Verwendung von IgG-Antikörpern oder deren monovalenten Fragmenten (Fab) stellt sich die Frage nach den Unterschieden der Inhibitionen, die sie bewirken. Es gibt solche Unterschiede, sie sind dargestellt in Abb.15.

Wir erkennen aus diesen Experimenten: Die meisten Immun-IgG und -Fab inhibieren stärker als das jeweilige NIS, zweitens gibt es qualitative Unterschiede des Grades der Inhibition bei vergleichbaren molaren Verhältnissen von Ribosomen und Antikörpern bzw. deren Fragmenten. Man kann nun willkürlich aus den Kurven drei Kategorien der Inhibitionsverhältnisse herauslesen (wenn man 15 % als maximalen Fehler der Abweichung annimmt, was sich aus der Reproduzierbarkeit der Experimente ergibt):

- a) IgG- und FabI-Inhibition sind etwa gleich stark,
 - b) die IgG-Inhibition ist stärker als die FabI-Inhibition,
 - c) die IgG-Inhibition ist schwächer als die FabI-Inhibition
- (Tab.1, Seite 57)

IgG or FabI-induced Inhibition of PolyU-PolyPhe system



Legende zu Abb.15

Inhibitionskurven, die durch Zugabe von spezifischen IgG- und FabI-Fraktionen zu einem in vitro Poly-Phe-synthetisierenden System erhalten wurden. Die Kurven stellen die 15'-Werte von Kinetiken dar, die mit verschiedenen Antikörper-Konzentrationen erhalten wurden. Es ist die Restaktivität in Prozent über der Antikörper-Konzentration aufgetragen. Die an den Kurven stehenden Ziffern bezeichnen die einzelnen Serumspender. Übrige Bedingungen siehe Text.

Es ist bereits angedeutet worden, welche Art von Inhibitionen eines Poly-U-abhängigen Poly-Phe-Systems man erwarten kann. Bei gleicher Inhibition von IgG und dem entsprechenden Fab sollte man deshalb auf gleiche Primäreffekte schließen können, weil sich an dem System nichts als das Molekulargewicht und die Valenz des Antikörpers geändert hat. Mit dem Molekulargewicht ändert sich der isoelektrische Punkt bei dieser Art der Spaltung (Abb.10), was dadurch zustande kommt, daß das relativ saure Fc-Fragment abgespalten wird. Durch Abtrennung von FabII, das saurer ist als FabI, kommt es zu einer Anreicherung der basischen FabI-Fraktion im Gegensatz zum Ausgangs-IgG. Um so weniger ist daher von der FabI-Fraktion eine unspezifische Reaktion mit den basischen ribosomalen Proteinen auf Grund von heteropolaren Reaktionen möglich. Eine unspezifische Interaktion des Fab's mit der rRNS kann nicht völlig ausgeschlossen werden.

Wie aus dem CM 32-Profil (Abb.10) hervorgeht, ist eine gegenseitige Kontaminierung von FabII und Fc zu erwarten, während FabI rein sein sollte; daß dies tatsächlich der Fall ist, wird demonstriert durch einen Ouchterlony-Doppeldiffusionstest (Abb.11). Hier befinden sich die vier Komponenten IgG, FabI, FabII und Fc miteinander in Äquivalenz. Sie wurden entwickelt gegen Anti-Kaninchen-IgG-Schafserum.

Deutlich sieht man hier die Verhältnisse in bezug auf Verunreinigungen:

Es gelten:  = Nicht-Kreuzreaktionen, beide Komponenten haben keine gemeinsame Determinante, sie sind völlig verschieden voneinander.

-  = "Spur"-Formation oder Sporn-Bildung, d.h. die längere Komponente besitzt im großen und ganzen die gleichen Determinanten wie die kürzere, jedoch fehlen der kürzeren Komponente einige Determinanten, die die andere besitzt.
-  = Kreuzreaktion: Beide Komponenten sind immunologisch identisch.

Komplette Kreuzreaktion sieht man zwischen FabI und dem vom Fc am weitesten abgetrennten FabII_V. Beide und FabII bilden mit IgG eine "Spur"-Formation. FabII zeigt jedoch auch schon mit FabI einen leichten Sporn, was bedeutet, daß FabII wahrscheinlich mit Fc verunreinigt ist. FabI und FabII_V geben mit Fc keinerlei Reaktion, während FabII mit Fc eine starke Kreuzreaktion zeigt. Hier liegt der Beweis für die Verunreinigung des FabII (als Gesamtpeak!) mit Fc.

Auch Zellulose-Acetatgel-Elektrophoresen (CAG) zeigten dasselbe Resultat: FabII ist stets mit Fc verunreinigt. Es werden hier die Kurven eines optischen Densitometers der CAG-Elektrophorese gezeigt.

Abb.12 zeigt die elektrophoretische Abweichung des gesamten FabII vom FabI, sie macht den Grad der Überlappung von FabII und Fc deutlich und zeigt schließlich, daß FabI mit Fc kaum überlappt.

Immunoelektrophoretische Auftrennungen bestätigen das Bild (Abb.13). Die vorliegenden Experimente konnten also nur mit der FabI-Fraktion und mit kompletten IgG-Präparationen durchgeführt werden. Die mit dem FabII-Gipfel eluierten spezifischen Antikörper gingen verloren. Falls spezifisch inhibierende Antikörper in dieser Fraktion gewesen waren, sollte dies zu einer Verringerung des inhibitorischen Effekts beim FabI im Vergleich zum IgG führen.

Inhibitionen des Poly-U-Systems mit FabII oder Fc waren sehr stark. Das legt den Schluß nahe, daß die relativ sauren Proteine Fc und FabII bzw. der Fc-Anteil des FabII unspezifisch mit den basischen Proteinen des Ribosoms reagieren. Hinzu kommt, daß basische Antigene spezifische saure Anti-

körper induzieren (147,169). Nur durch Affinitätschromatographie ließen sich die spezifischen FabII-Fragmente von den unspezifischen Fragmenten und vom Fc-Anteil separieren. Im Augenblick sind deshalb die reinen Effekte des FabII nicht zu untersuchen. Der Anteil des Fc im FabII dürfte mit Schwankungen etwa 10 % betragen. Es scheint jedoch so zu sein, daß das Fc in situ, d.h. im kompletten IgG-Molekül nicht zur Reaktion mit dem Ribosom befähigt ist, sei es, daß die sterische "Konformation" des Antikörpers dieses verhindert, sei es, daß die Bindungskonstanten der beiden Fab-Arme bei der spezifischen Bindung um Dimensionen größer sind als die unspezifische Assoziationskonstante des Fc. Dieser Schluß ergibt sich aus dem Verhalten der Nicht-Immunseren, die i.G. zu isolierten Fc-Präparationen nicht inhibieren.

Es kann also geschlossen werden, daß bei relativ schwacher Inhibition des FabI i.G. zum IgG ein Verlust an Spezifität zu diesem Effekt führen kann.

Zwei schon erwähnte wichtige Punkte sind die Größe und die Bivalenz des IgG-Moleküls. Die Wirkung der Bivalenz ist in anderen Experimenten mit Saccharose-Gradienten und Ultrazentrifugation demonstriert worden (Stöffler et.al., Manuskript in Vorbereitung).

Es gilt, daß ein 7S-Antikörper mit seinen beiden identischen Valenzen bei nur einer vorhandenen spezifischen Determinante an den Ribosomen diese rotationssymmetrisch fixieren muß (105). Die relative Lage der beiden Ribosomen zueinander kann deshalb kaum geeignet sein, auf ein und derselben Boten-Ribonukleinsäure eine Proteinbiosynthese durchzuführen.

Die Größe der Moleküle ist der andere wichtige Punkt. Es ist einleuchtend, daß ein Molekulargewicht von 50 000 Dalton (Fab) sich weniger störend auf ribosomale Funktionen auswirken sollte, als ein solches von 150 000 Dalton (IgG). Hier muß in den Dimensionen der Ribosomen von den Vorstellungen der klassischen Mechanik abgegangen werden, weil der Einfluß kleiner Kräfte wie z.B. der Van-der-Waals-, London- und ähnlicher Kräfte sehr groß wird. Die sterische Behinderung der

ribosomalen Funktion durch z.B. einen freien Arm des IgG-Moleküls, sei es Fab oder Fc, wird unabschätzbar verstärkt durch molekulare Kräfte des oben erwähnten Typs, wobei die Lage heteropolarer Valenzen, oszillierender π -Elektronen und freier Ionen das Problem unlösbar erscheinen lassen.

Folgende Möglichkeiten können als Gründe für eine stärkere Inhibition des Fab-Fragments im Vergleich zum IgG diskutiert werden. Eine Determinante könnte sterisch für einen Antikörper sehr schlecht zugänglich sein. In einem solchen Falle könnte unter Umständen wohl das kleinere Fab nicht aber das komplette IgG-Molekül spezifisch binden. Man könnte auch den Fall annehmen, daß nur die FabI-Fraktion die spezifisch inhibierenden Antikörper enthält, während die FabII-Fraktion keinerlei spezifische Antikörper aufweist. Dann müßte diese Fraktion spezifisch stärkere Effekte auslösen als die zugehörige IgG-Fraktion.

Die unterschiedlichen Bereiche der Peptidsynthese-Kinetik unter dem Einfluß von Antikörpern.

Poly-U-kodierte Poly-Phenylalanin-synthetisierende in vitro-Systeme erreichten unter den in Material und Methoden genannten Bedingungen nach 60' Inkubationsdauer ein Plateau. (Abb. 16)

Dieses Plateau wurde auch nach 3-stündiger Inkubationszeit konstant beibehalten. Ist in einem in vitro-System eine essentielle Komponente (tRNS, Phenylalanin, Ribosomen, etc.) in ihrem Vorrat erschöpft, so kann kein weiteres Protein mehr entstehen. Die Kinetik mündet in ein Plateau ein. In den durchgeführten Experimenten waren stets die Ribosomen limitierender Faktor. Da sie bei der Proteinbiosynthese in hoher Mg^{++} -Konzentration an Poly-Uridylsäure synthetisieren, laufen sie nicht vom messenger ab. Das heißt, am 3'-OH-Terminus des messengers stauen sich die Ribosomen und werden dadurch inaktiv, sie gehen der weiteren Proteinsynthese verloren. In der Abb.16 stellt die gestrichelte Kurve eine Kinetik dar, die mit einem wesentlich kürzeren Poly-U-messenger (93) durchgeführt wurde. Das Plateau wird auch hier wesentlich früher

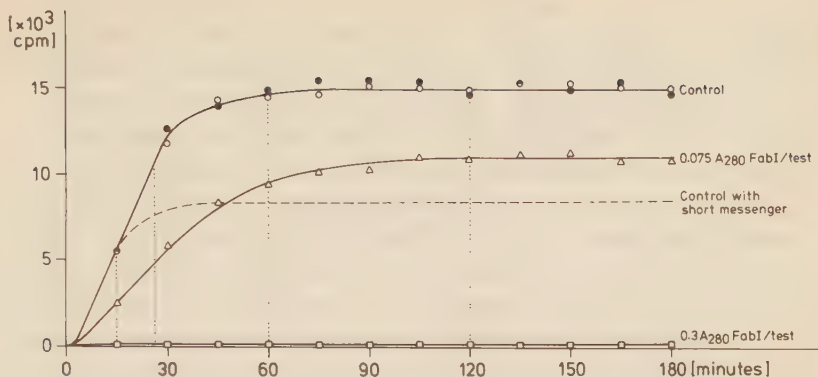


Abb. 16

Langzeitkinetik mit ($\Delta \square$) und ohne ($\circ \bullet$) Antikörper sowie Kontrolle mit kurzer m-RNS (---). Es sind aufgetragen die Zählimpulse pro Minute des TCA-präzipitierbaren radioaktiven Materials über der Zeit. Proteasenaktivität ist über die hier getestete Zeit nicht zu bemerken. (Weitere Erklärungen im Text)

erreicht, nämlich bei ca. 35'. Selbstverständlich ist auch die Höhe des Plateaus gesenkt, da die synthetisierten Peptide in ihrer Länge der Länge des messengers entsprechen.

Aus der konstanten Beibehaltung des Plateaus über längere Zeiten läßt sich zeigen, daß weder Proteasen noch Peptidasen in dem System aktiv sind.

Der unter steilem und mit nahezu konstantem Winkel ansteigende Ast der Kinetik gibt unmittelbar Aufschluß über die Aktivität des nichtlimitierten Systems. Deshalb wurde jeweils die Inkubationszeit zur Auswertung herangezogen, bei der die Kontrolle noch gerade auf dem Ast mit der ungefähr konstanten Steigung lag. Das war in der Regel bei 15' der Fall, manchmal lag der Punkt aber auch bei 20, 30 oder 40', je nach Ribosomenpräparation. Durch dieses Verfahren wurde eine gute Vergleichbarkeit der Inhibitionswerte in unterschiedlich reagierenden Systemen erreicht. Und noch etwas zeigt sich in diesem Zusammenhang in Abb. 16: die Inhibitionswerte für das FabI (0,075 A₂₈₀/test) für 15', 26', 60' und 120' liegen bei 46 %, 44 %, 42 % und 40 %.

47 %, 65 % und 74 % Restaktivität. Hier überlagern sich offensichtlich mindestens zwei Phänomene: Eine Inhibition von 26 % im Bereich des Plateaus besagt, daß insgesamt 26 % weniger Protein synthetisiert wurde, eine Inhibition im ansteigenden linearen Bereich der Kurve sagt aber noch mehr aus, nämlich, daß in diesem Falle ca. 54 % weniger Protein bei gleicher Zeit und in nichtlimitiertem System (Ribosomen ausgenommen) entstanden sind. Aus der Differenz der beiden Inhibitionswerte ergibt sich ein differenziertes Bild: Für die 26 % Verlust bei der Proteinsynthese muß ein Totalausfall von 26 % der Ribosomen verantwortlich gemacht werden. Für die Differenz der beiden Inhibitionen $54 \% - 26 \% = 28 \%$ kann aber nur mit einem Aktivitätsverlust der Ribosomen argumentiert werden, d.h. die Ribosomen synthetisieren in diesem Falle die gleiche Menge Protein wie bei einem Totalausfall der Ribosomen von 26 %. Sie benötigen dafür aber etwa die doppelte Zeit. 28 % der Ribosomen sind also langsamer als der Rest der Vollaktiven. Die Auswertung in dem nichtlimitierten Teil der Kinetik bringt deshalb mehr Information als die im Plateaubereich.

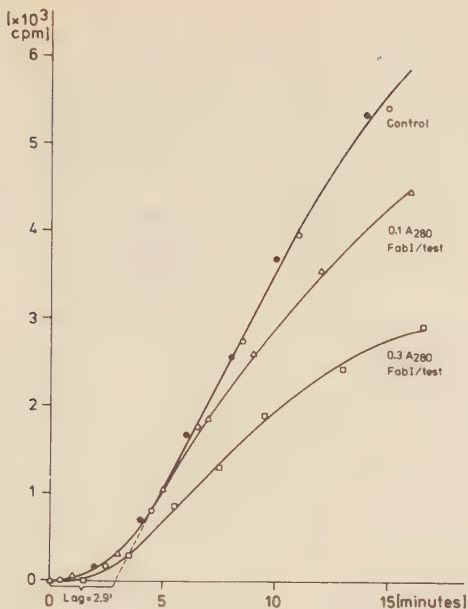
Der Anfang der Kinetik beginnt stets mit einer Verzögerungs- oder Lag-Phase (Abb.17), d.h. einer Phase, in der die volle Aktivität des Systems hergestellt wird, das gilt auch für das System mit Antikörpern. Die Lag-Phase des zellfreien Systems betrug etwa 2,5'.

Ein Anteil davon ist zunächst die Erwärmung des Reagenzglases und des Reaktionsgemisches von 0°C auf die Inkubationstemperatur von 35°C . Gleichzeitig beginnen natürliche Ribosom-Messenger-Proteinkomplexe das angefangene Protein zu Ende zu synthetisieren und, da native messenger ein Terminator-Kodon besitzen, und weil alle übrigen Komponenten wie Faktoren, Aminosäuren, Enzyme etc. im S-100 vorhanden sind, kann das Ribosom einen echten Terminus auch in hoher Mg^{++} -Konzentration erreichen. Dabei wird es frei, um sofort einen Komplex mit einem Poly-U-messenger zu formen.

Der linear ansteigende Teil der Kinetik überbrückte die Zeit von 2,5' bis ca. 30'. Dieser Abschnitt wurde für die Berechnung und Interpretation der Inhibitionskinetiken als Kon-

Abb.17

Darstellung der Verzögerungsphase in einem in vitro Poly-U-Poly-Phe-System unter dem Einfluß von Antikörperfragmenten.



trolle zu grunde gelegt, da nur in diesem Abschnitt die Ribosomen limitierend waren.

Ein eigenartiges Verhalten des Systems ergab sich bei Vorinkubation der Ribosomen zusammen mit Antikörpern (Abb18).

Da die Ribosomen nur in Ribosomenpuffer oder MixI (s.Seite 35) 15' bei 30°C vorinkubiert wurden, konnte natürlich die Lag-Phase nicht verschwinden (keine Faktoren und Aminosäuren etc. vorhanden!). Die beiden Kontrollen mit und ohne Vorinkubation unterscheiden sich nicht signifikant. Zusammen mit dem IgG ergab sich jedoch in der Regel eine stärkere Inhibition bei den vorinkubierten Gemischen. In wenigen Fällen wurde auch (so beim Protein S15) der umgekehrte Effekt erreicht, die praeinkubierten Gemische inhibierten wesentlich schwächer als im Standardtest. Der Effekt muß gedeutet werden als Änderung der Wechselwirkung zwischen Ribosomen und Antikörpern. Jedoch ist jede weitere Aussage ohne fortführende Experimente nur spekulativ. Es könnte z.B. sein, daß die Vorinkubation eine Art der Komplexbildung Ribosom-Immunglobulin erlaubt, die in Anwesenheit der übrigen Komponenten des Systems nicht

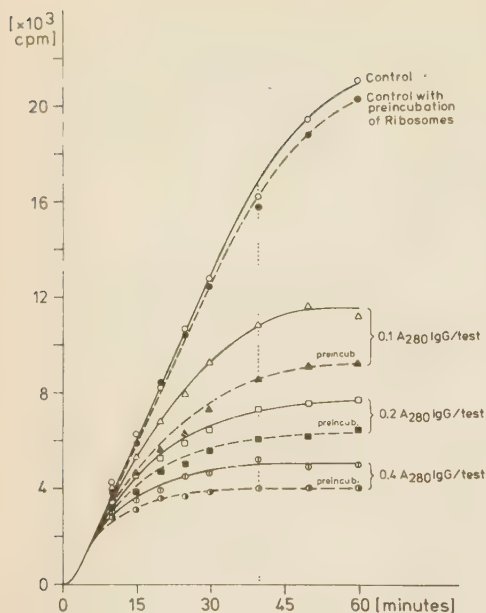


Abb. 18

In vitro Poly-U-Poly-Phe-Kinetiken mit (---) und ohne (—) Praeinkubation der Ribosomen unter dem Einfluß von 7S-Antikörpern. Aufgetragen sind die Zählimpulse pro Minute des präzipitierbaren radioaktiven Materials über der Zeit. Beschreibung im Text.

möglich ist. Ebenso könnte bei Nichtvorinkubation ein gewisser Teil von spezifischen Antikörpern kompetitiv oder inaktiv ausgeschlossen bleiben.

Individualspezifitäten verschiedener Antiseren

Unter Individualspezifität versteht man Unterschiede in der Immunreaktion verschiedener Individuen einer Spezies nach Applikation identischer Immunogene.

Um aufgetretene Individualspezifitäten in der Qualität der Seren bei etwa gleichen spezifischen Titern zu erkennen, kamen, wenn möglich, Seren identischer Antigene von mehreren Tieren zum Experiment. Im Durchschnitt wurden individuelle Streuungen der Inhibition des Poly-U-Systems bis zu 35 % Inhibitionsdifferenz beobachtet.

Am Beispiel der Inhibition von vier verschiedenen IgG-Präparationen, die von vier verschiedenen Tieren stammten, zeigte sich bei Protein S15 eine Inhibitionsdifferenz bei 0,075 A₂₈₀IgG/Test von ca. 33 %, während sie aber bei 0,45 A₂₈₀

IgG/Test nur noch ca. 6 % ausmachte (nicht dargestellt). Abb.19 zeigt das typische Inhibitionsverhalten einiger individueller FabI-Präparationen im Test (NIS, S2, S3, S8, S11).

Hier zeigen die Anti-S5, -S19, -S20 und -S21-FabI-Präparationen ein sonst nicht übliches Bild, nämlich das starke Divergieren der Kurven im beginnenden Plateaubereich. NIS-FabI-Präparationen und NIS-IgG-Präparationen zeigten immer nur eine Divergenz bis zu maximal 10 %, was etwa dem experimentellen Fehler entspricht.

Titerdifferenzen der Seren, wie sie bei Protein S14 in Abb.19 dargestellt sind, sind leicht durch die in Material und Methoden beschriebenen Verfahren zu erfassen und können durch Anreicherung ausgeglichen werden. Das Anti-S14-Fab₁₆₀I war z.B. etwa dreimal stärker als das Fab des Tieres Nr. 306.

Bei den schwachen oder Nicht-Inhibitoren läßt sich, trotz Verwendung verschiedener Seren, bei gleich schwachem Ergebnis, der Fall nicht ganz ausschließen, daß sämtliche untersuchten Tiere das spezielle Antigen, das auf der Oberfläche des intakten Ribosoms in situ erscheint, nicht erkannt haben, d.h. nur schwache oder wenige Antikörper bilden konnten, obwohl die Determinanten frei zugänglich sind. Bei spezifisch wirkenden starken Seren ist der umgekehrte Fall schwer denkbar.

Individualspezifitäten können durch sehr verschiedene Ursachen entstehen. Wir haben das bekannte Phänomen der Änderung der Affinität der Antikörper mit zunehmender Zeit nach der Immunisierung (96) durch Vereinigung der dicht beieinander liegenden Blutentnahmen und Titervergleich ausgeschaltet. Doch das Prinzip der Antikörperentstehung mit seiner statistischen Genauigkeit läßt sich bislang noch nicht manipulieren. Solange das Phänomen der in vitro Erkennung des Antigens noch nicht restlos aufgeklärt ist, und die Immunologie ist hier erst am Anfang, läßt sich nicht sagen, warum die eine gegebene Determinante bei einem Tier sehr gut und bei einem anderen derselben Spezies weniger gut erkannt wird. Auch die Affinität der gegen ähnliche Determinanten gerichteten Antikörper ist verschieden, wie für Haptene gezeigt werden



Legende zu Abb.19

Durch spezifische Fab's gegen einzelne ribosomale Proteine hervorgerufene Inhibitionen eines in vitro Poly-U-Poly-Phe-Systems (s. Legende Abb.15). Antikörper gegen S5, S19, S20, S21 zeigen ungewöhnliche Streuungen titergleicher Seren verschiedener Spender sowie bei S14 die Auswirkung eines Titerunterschiedes um den Faktor 3. Der Übersichtlichkeit halber sind identische Kurven weggelassen. Weitere Erläuterungen im Text.

konnte (94,95,96).

Grundsätzlich sollte aber für die Art der Experimente, wie sie hier angestellt werden, erwartet werden, daß ein Antikörper, der exakt in einem funktionellen Zentrum des Ribosoms "bindet", einen Totalausfall der untersuchten Funktion herbeiführt. Da auch hier aus statistischen Gründen stets Ribosomen unbehelligt bleiben, sind alle starken Inhibitionen von vornherein als "Kandidaten" anzusehen. Bei allen Zwischenstufen der Inhibition muß von Fall zu Fall oder im Zusammenhang mit anderen Resultaten beurteilt werden, was sich abgespielt hat. Das ist naturgemäß in diesen Fällen mit einem großen Unsicherheitsfaktor behaftet. In der Regel wurden für die Experimente nur starke Seren verwendet.

Möglichkeiten der Auswertung

Unter den auf Seite 48 ff genannten Gesichtspunkten erscheint es zweckmäßig, Inhibitionen in Poly-U-kodierten Poly-Phe-Systemen dadurch auszuwerten, daß man Antikörper-Konzentrationskurven für z.B. die 15'-Werte der Kinetiken vergleicht. Das ist geschehen in Abb.15 und Abb.19.

Da quantitative Aussagen hier nur schwierig abstufbar sind, wurde an die Inhibitionsgraphen ein subjektives Klassifikationsmuster angelegt, nach welchem die Fab's in schwache bis sehr starke Inhibitoren eingeteilt wurden.

Abb.20 zeigt, daß in den nichtinhibitorischen Bereich (0) alle NIS-Effekte fallen. Die weitere Einteilung, wonach diese den Charakteristika der Inhibitionskurven folgte, ist: schwach (+), bis 50 % Plateauwert, mittel (++), bis 75 % Plateauwert, stark (+++), bis 98 % Plateauwert und sehr stark

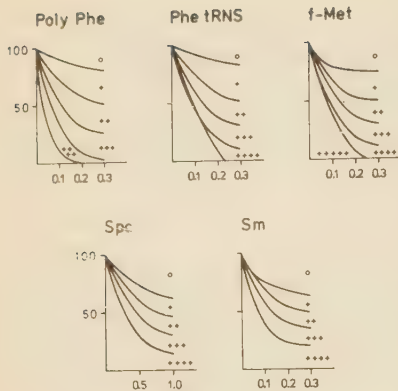


Abb. 20

Klassifikationsschema der durch Antikörper verursachten Inhibitionen von Funktionen, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Die Stärke der Inhibitionen ist durch subjektive Bereiche festgelegt, die mit 0 (nicht inhibitorisch) bzw. Kreuzen gekennzeichnet sind. Die Koordinatensysteme entsprechen denen der Gesamtübersichten. An dieser Stelle ist also das mit "Poly-Phe" bezeichnete Schema mit den Abb. 15 und 19 zu vergleichen (s. Text).

(++++), bis 100 % Plateauwert und Begrenzung durch den maximalen Inhibitor Anti-S11₂₂₂.

Eine weitere Auswertung wurde dadurch vorgenommen, daß, wie auf Seite 48 ff angedeutet, die Inhibition der Plateauwerte der Kontrolle und der Inhibitionskurve mit einer FabI-Konzentration von 0,075 A₂₈₀/Test voneinander subtrahiert wurden. Sie wurden verglichen mit den entsprechenden Werten des 15'-Inkubationswertes. Es war das Ziel, diejenigen Proteine aufzufinden, bei denen eine Differenz zwischen Totalausfall der Ribosomen durch Inhibition und verlangsamer Proteinbiosynthese durch teilinaktivierte einzelne Ribosomen auftrat.

Auswertung

Abb. 15 zeigt die typischen Inhibitionskurven, die durch 7S-Immunglobuline der Klasse IgG und deren monovalente papain-gespaltene Fragmente (FabI) erhalten wurden. Jede Kurve ist durch wiederholte Experimente verifiziert worden. Verglichen wurden nur FabI-Präparationen mit IgG-Präparaten, die aus dem Serum desselben Tieres stammten.

Tabelle 1 vergleicht die Übereinstimmung oder Nichtübereinstimmung der Inhibitionen, wobei die Unterschiede wie folgt in drei Klassen unterteilt werden (siehe auch Seite 43):

Inhibition	Anti Protein						
FabI=IgG <i>Stöchiometrie</i>	S1 <i>F</i>	S2 <i>F</i>	S11 <i>F</i>	S12 <i>F</i>	(S16) <i>U</i>	S18 <i>F</i>	S20 <i>F/U</i> <i>F</i>
FabI<IgG <i>Stöchiometrie</i>	S3 <i>M</i> <i>U</i>	S4 <i>U</i>	S5 <i>U</i>	(S6) <i>F</i>	S7 <i>U</i>	S8 <i>U</i>	S15 <i>U</i>
FabI>IgG <i>Stöchiometrie</i>	(S9) <i>U</i>	S10 <i>F</i>	S13 <i>M</i>	S14 <i>F</i>	S19 <i>F</i>	S21 <i>F</i>	

Tab.1

Vergleich der Inhibitionen des in vitro Poly-U-Poly-Phe-Systems hervorgerufen durch 7S-Antikörper (IgG) und deren monovalente Fragmente (FabI). Erläuterungen s. Text.

- a) FabI-Inhibition = IgG-Inhibition,
 b) FabI-Inhibition < IgG-Inhibition und
 c) FabI-Inhibition > IgG-Inhibition.

Für die Zuordnung zu den Klassen b) und c) waren mindestens 15 % Inhibitionsdifferenz erforderlich. Die in Klammern befindlichen Werte deuten Nichtsignifikanz an. Die Proteine in den drei Klassen der Tabelle werden mit den Abkürzungen für die Stöchiometrie der 30S-Proteine verglichen (siehe Einleitung).

Alle Proteine mit gleicher Inhibition durch IgG wie FabI bis auf S16 gehören zur Gruppe der "fractional"-Proteine. Für Anti-S16 sind beide Inhibitionen nicht gleich. Zur Gruppe, bei der das FabI schwächer inhibiert als das entsprechende IgG, gehören mit Ausnahme von S6 (F) nur "unit"-Proteine, also solche, die stets in einer Kopie im Ribosom zu finden sind. Zur letzten Gruppe (FabI > IgG) schließlich gehören wieder in der Mehrzahl "fractional"-Proteine.

Unter den auf Seite 43 ff besprochenen Gesichtspunkten wurde der Versuch unternommen, eine grob quantifizierende Einteilung der Inhibitoren zu unternehmen. Es wurde auf die auf Seite 55 besprochene Klassifikation der Abb.19 zurückgegriffen und danach die Tabelle 2 aufgestellt.

Hier gibt es nun zwei sehr starke Inhibitoren, nämlich Anti-S9- und Anti-S11-FabI, die nur noch übertroffen werden von den auf Seite 7 erwähnten Inhibitoren der Proteine L7/L12 (50S-Untereinheit). Zu den starken Inhibitoren gehören die Anti-S3DE, -S10-, -S13-, -S14-, -S18-, -S19-, -S20- und -S21-Fab's.

Anti-Sx FAB I	Grad der Inhibition	Stärkste Inhibition	Relative schwach	mittel	Inhibition stark	sehr stark
NIS	o	o				
S 1	x x	x x	-	+		
S 2	x x	x x		+		
S 3	x x x DE	(x) x x		+	+DE	
S 4	x x	x x		+		
S 5	x x	x x		+		
S 6	(x)	(x)	+			
S 7	x	x	+			
S 8	x x	x x x		+		
S 9	x x x x	x x x x				+
S 10	x x x	x x x			+	
S 11	x x x x	x x x x				+
S 12	x	x	+			
S 13	(x) x	x x x			+	
S 14	x x x	x x x			+	
S 15	x	x	+			
S 16	x	x	+			
S 17	—	—	—	—	—	—
S 18	x x x	x x x			+	
S 19	x x x	x x x			+	
S 20	x x x	x x x			+	
S 21	x x x	x x x			+	

Tab.2

Relative Inhibitionen der Poly-U-Poly-Phe-Synthese durch FabI. Die in Abb.19 auftretenden Individualspezifitäten sind in Spalte 2 (Grad der Inhibition) aufgeführt. Zur Auswertung wurden die jeweils stärksten Inhibitionen herangezogen (Spalte 3). Weitere Erklärungen im Text.

Bei Anti-S3 wurden in diesem Fall die DEAE-cuts (siehe Seite 27 ff) getestet, die eine Aufteilung in schwächer (DE III) und stärker (DE II) als das entsprechende IgG erkennen lassen. Nur DEAE-cut II gehört in die Klasse der starken Inhibitoren. Die Proteine S1 bis S5 und S8 werden durch Fab's derart angegriffen, daß eine mittlere Inhibition resultiert. Nur fünf Proteine (S6, S7, S12, S15, S16) gehören zu den wirklich schwach wirkenden Antigenen, was ihre Funktion betrifft, wobei deutlich S6 das schwächste ist.

Wie schon am Anfang der Arbeit gesagt, kam S17 nicht zur Auswertung, da sich dieses Protein nur mit einem größeren Teil des Proteins S16 isolieren läßt und daher immunologisch als Antigen nicht rein genug war. Das gilt auch für alle weiteren Experimente.

Der Versuch einer Auswertung der auf Seite 55 ff und 48 ff besprochenen Kinetiken in bezug auf unterschiedliche Inhibitionen im Plateaubereich und im konstant steigenden Teil der Kinetik wurde unternommen. Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse.

Tab.3

Auswertung der Art der Inhibition durch FabI-Antikörper. Erklärungen im Text.

Protein	Tier	Q075 A ₂₈₀ FabI/test [inhib _{45'} minus inhib _{60'}]	Gruppe
S 1			
S 2	65/307	+11% / -3%	B/A
S 3	124/123	+7 % / -2 %	B/A
S 4	194	+6 %	B
S 5	57 _{II} /113 _{II}	-3 % / +3 %	A/A
S 6			
S 7	137 _{II}	+17 %	B
S 8	362/77	+2 % / +5 %	A/A
S 9	296/132 _{IV}	-3 % / +19 %	A/B
S10	173 _I	-26 %	C
S11	308/222	+19 % / +15 %	B/B
S12	129 ^a	-7 %	C
S13	143	+11 %	B
S14	306	+18 %	B
S15	146 _I	+14 %	B
S16			
S17	---	---	---
S18	133 ₂₅₀	+1 %	A
S19			
S20	145	+1 %	A
S21	199/188 _I	+9 % / +4 %	B/A

Es wurden in der Spalte 3 der Inhibitionswert bei 60' Inkubationsdauer von dem entsprechenden 15'-Wert subtrahiert. Dabei wurden als A die Werte von -5 % bis +5 %, d.h. "keine" Differenz (= Totalausfall der Ribosomen für die Proteinsynthese), als B die Werte von +6 % bis max. % (= Totalausfall + durch Fab's verlangsamte Ribosomen) und als C die restlichen Werte von -6 % bis -min %, in denen sich ein zeitabhängiger Ribosomenausfall widerspiegelt, aufgeführt.

B-Proteine sind eindeutig S4, S7, S11, S13, S14, S15, weniger eindeutig dagegen S1, S2, S9 und S21. Ribosomen, bei denen diese Proteine mit spezifischen FabI-Fragmenten reagieren, fallen für die Proteinsynthese entweder ganz aus (Plateau bei 60') oder können z.T. verlangsamt weiterhin Protein synthetisieren.

Eine Auswertung betreffend die Topographie der 30S-Proteine innerhalb der intakten Untereinheit des E. coli-Ribosoms läßt sich aus Abb.15 vornehmen. Dazu wurden nur Fab-Ergebnisse herangezogen. Inhibitionen wurden aus Gründen der relativ

größeren Unspezifität (siehe Seite 43 ff) weggelassen. Alle Proteine der kleinen Untereinheit (S17 nicht getestet) werden von Antikörperfragmenten angegriffen und tragen dadurch zu einer Funktionsstörung bei der Poly-Phe-Synthese bei. Das impliziert aber, daß jedes Protein mit wenigstens einer Determinante an die Oberfläche des Ribosoms kommt und sei es auch nur, bei Voraussetzung eines dynamischen Ribosoms, für einen definierten Zeitraum. Wir sagen, jedes ribosomale Protein ist in der 30S-Untereinheit akzessibel. Das war von vornherein nicht anzunehmen, da diverse andere Untersuchungen zu gegen- teiligen Ergebnissen führten (159-163). Der Ausschluß der schwachen Inhibitoren erfolgt auf Seite 68 und 84.

Beeinflussung der EF-Tu-abhängigen Bindung von Phe-tRNS in der "A-site" der 30S-Untereinheit des Ribosoms durch Antikörperfragmente.

Das Ziel dieser Experimente war es, in einem EF-G-freien System die EF-Tu-abhängige Bindung von Phe-tRNS in dem "A-site"-Anteil der kleinen ribosomalen Untereinheit mit spezifischen Antikörperfragmenten (Fab) zu blockieren. Auf diese Weise sollte etwas über das oder die Proteine ausgesagt werden, die an der Formation der Bindungsstelle der Phe-tRNS beteiligt sind. Da, wie in der Einleitung erwähnt, in Gegenwart von EF-G die Translokation der Peptidsynthese abläuft und für die größere Anzahl der Experimente nur T-Faktor (EF-Tu, EF-Ts und EF-G) zur Verfügung stand, wurde das Antibiotikum Fusidinsäure zum Experiment hinzugegeben. Fusidinsäure blockiert die Elongation (Translokation).

In diesen Experimenten wird versucht, eine transfer-Ribonukleinsäure mit dem Molekulargewicht von ca. 23 000 und den ungefähren Abmessungen 80 Å x 20 Å (Hefe-Phe-tRNS) (97) durch ein ähnlich großes IgG-Fragment (FabI), M: 50 000, Maße: 70 Å x 50 Å (98,99,100) bei seiner Bindung an das Ribosom zu behindern oder zu verdrängen.

Befunde von Randall-Hazelbauer und Kurland (22) zeigten, daß die Proteine S2, S3 und S14 kooperativ die faktorabhängige aa-tRNS-Bindung an das Ribosom stimulieren. Sie schließen

daraus auf die Beteiligung dieser drei Proteine an der "A-site" der 30S-Untereinheit. Aus diesem Grunde wurden auch Experimente durchgeführt, wobei alle Kombinationen von Fab's gegen die Proteine S2, S3 und S14 im Phe-tRNS-Bindungsexperiment untersucht wurden.

Optimierung des Systems

Unter den optimalen Salzbedingungen für eine Poly-Phe-Synthese mit Poly-U-messenger wurde für folgende Komponenten und Bedingungen optimiert: Fusidinsäure, Inkubationsdauer, Phe-tRNS, Poly-U, T-Faktor bzw. EF-Tu.

Fusidinsäure: 7 μ l Fusidinsäure (= 1,4 nMol) pro Test inhibierte die Elongation völlig. Die Kontrolle mit EF-G-freiem EF-Tu ergab mit und ohne Fusidinsäure dieselben Ergebnisse.

Inkubationsdauer: Sie ergab sich aus der maximalen Zeit, die das System mit Fusidinsäure brauchte, um ein Plateau zu erreichen. Sie betrug 20' und war im EF-G-freien System ohne Fusidinsäure kürzer.

¹⁴C-Phe-tRNS: Es wurde ein Phe-tRNS-Bindungstest mit verschiedenen tRNS-Konzentrationen bis zur Sättigung durchgeführt und eine Phe-tRNS-Konzentration kurz nach Erreichen des Sättigungs-Plateaus im Experiment eingesetzt. Je nach Präparation der tRNS (unfraktioniert) betrug sie 2 und 4 A₂₆₀ ¹⁴C-Phe-tRNS (unfraktioniert) pro Test.

Polyuridylsäure: Eine Konzentrationskurve ergab einen Bedarf von 50 μ g pro Experiment, um in den Sättigungsbereich zu kommen.

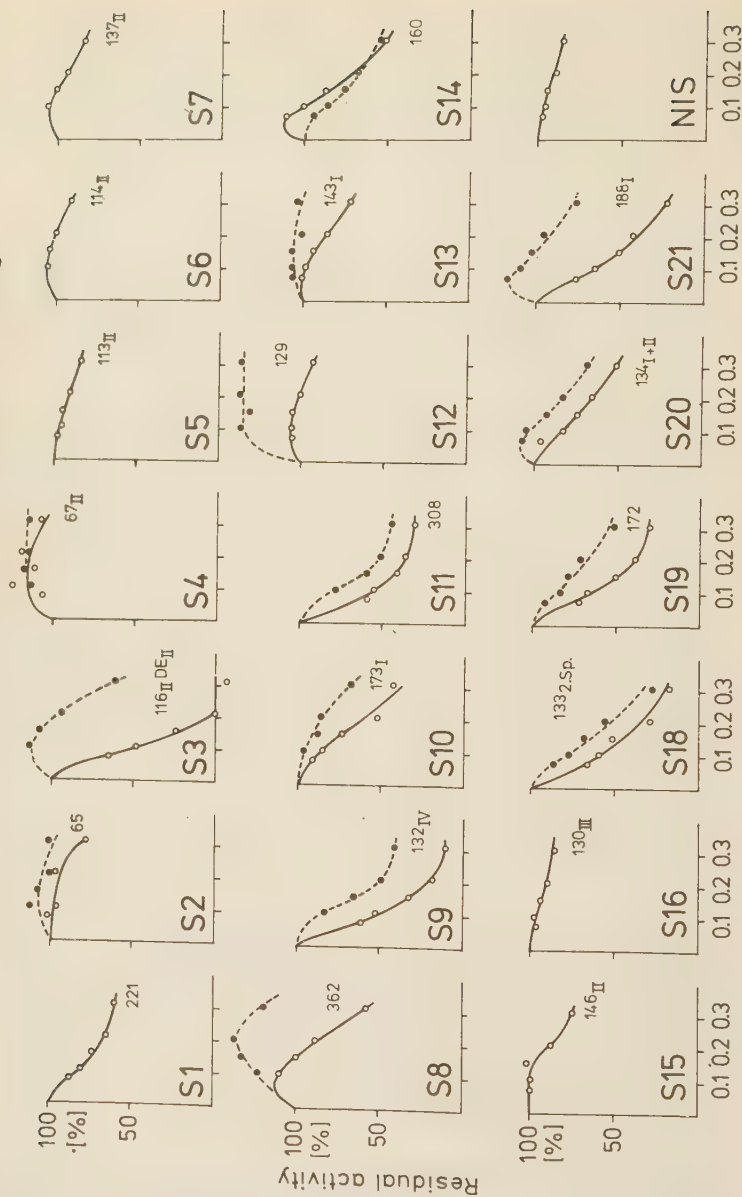
T-Faktor bzw. EF-Tu: Das Optimum lag hier bei 5 μ g Protein für T-Faktor bzw. die entsprechende Menge EF-Tu.

Ribosomen: 1molar NH₄Cl-gewaschene 30S- und 50S-Untereinheiten, sowie 70S-Ribosomen wurden zu je 10 pMol pro Test als limitierende Komponente zugegeben.

FabI-Antikörperfragmente: Das maximale molare Verhältnis FabI : Ribosomen betrug 516 : 1.

In einer kompletten Versuchsreihe wurden alle 30S-Proteine, mit Ausnahme von S17, auf ihre Funktion bei der Phe-tRNS-Bindung an 30S-Untereinheiten in Gegenwart von 50S-Partikeln

Inhibition of Enzymatic-Phe-tRNA-binding



A280 Fab I / test

Legende zu Abb.21

Inhibitionen der EF-Tu-abhängigen Phe-tRNS-Bindung an ribosomale 30S-Untereinheiten in Gegenwart von 50S-Partikeln sowie an undissoziierte 70S-Ribosomen durch monovalente Antikörperfragmente (FabI). Jeder Punkt einer Kurve entspricht der Inkubation mit einer Fab-Konzentration. Aufgetragen sind % Restaktivität über der Antikörperkonzentration. Die bei den Kurven stehenden Ziffern sind Tiernummern. Weitere Bedingungen im Text.

untersucht. Für einige Proteine wurden die Versuche auch mit undissoziierten 70S-Ribosomen durchgeführt.

Auswertung

Abb.21 zeigt die durch spezifische FabI hervorgerufenen Inhibitionen der enzymatischen Phe-tRNS-Bindung. Gegen die Antikörperkonzentration (Abszisse) wurde die Restaktivität des Systems aufgetragen (Ordinate). Wenn man zunächst nur die Inhibitionen in dem System mit den beiden Untereinheiten betrachtet, fällt eine sehr starke Wirkung auf, nämlich die von S3. Hier führt die Zugabe von 2/3 der Höchstmenge an Anti-S3-FabI schon zur völligen Blockierung des Systems, es wird von da ab keine weitere transfer-RNS von den Ribosomen gebunden.

Auch die Fragmente Anti-S9, -S18 und -S21 zeigen starke Effekte. Eine andere Gruppe von ribosomalen Proteinen dagegen fällt dadurch auf, daß hier keine oder wenig Inhibitionen beobachtet werden, es sind dies S2, S4, S5, S6, S7, S12, S16.

Zwischen diesen extremen Wirkungen liegen eine Reihe von Inhibitionen, die man weder als stark noch als nicht vorhanden bezeichnen kann.

Die Auswirkung einiger Antikörper auf das System mit undissoziierten 70S-Ribosomen waren stets etwas schwächer als die oben aufgezeigten. Jedoch gab es hier Ausnahmen, bei denen diese Inhibition wesentlich schwächer als die der Untereinheiten ausfiel. Hierher gehören die Inhibitionen der Fab's Anti-S3, -S8, -S9, -S12, -S13 und -S21. Allerdings wirken sich die Stimulationen bei Anti -S8 und -S12 störend aus. Stimulationen des Systems, die vorwiegend bei den Testen mit den undissoziierten Ribosomen auftraten, sieht man bei folgenden Proteinen: 70S: S3, S4, S8, S12, S13, S20, S21, S2; 30S+50S: S4,

S6, S7, S8, S12, S14. Hier waren die unabhängigen Kontrollen in allen Experimenten gleich, es handelt sich also um echte Stimulationen.

Zur Auswertung wurde auch hier ein Klassifikationsschema, das den gesamten Kurvenverlauf berücksichtigt, entworfen (Abb.20). Dieses Bewertungsschema orientiert sich an der Wirkung, die das Nichtimmunserum (NIS) auf die Phe-tRNS-Bindung ausübt und klassifiziert diesen Bereich als nichtinhibitorisch (0). Dieser Bereich weist eine maximale unspezifische Inhibition von 18 % auf. Die Proteine, die in diesen nichtinhibitorischen Bereich fallen, sind: S2, S4, S5, S6, S7, S12 und S16.

Als schwach inhibitorische Antikörper (+ = 19 - 50 % Inhibition) erweisen sich die Fab's gegen die ribosomalen Proteine S1, S8, S13 und S15. Wegen der starken Stimulation von Anti-S8 bei niedrigen Fab-Konzentrationen kommt dieses Protein u.U. in die nächst höhere Gruppe.

Mittelstarke Effekte (++ = 51 - 70 % Inhibition) werden bei den Proteinen S10, S11, S14, S19 und S20 gefunden.

Starke Inhibitionen (+++ = 71 - 90 %) der Phe-tRNS-Bindung an das Ribosom (30S) treten auf, wenn die Proteine S9, S18 und S21 durch ihre spezifischen Fab's angegriffen werden.

Den stärksten Erfolg (++++ = 91 - 100 %) erzielt man mit dem Anti-S3-Fab.

Diese Ergebnisse und die Befunde für 70S-Ribosomen sind in der Tabelle 4 zusammengestellt.

Wie schon gesagt, finden sich bei den Experimenten mit den 70S-Ribosomen oft Stimulationen. Die meisten getesteten Proteine zeigen in der Auswertung einen zu den 30S+50S-Testen etwas parallel verschobenen Kurvenverlauf, so S2, S4, S10, S11, S14, S18 und S20. Man könnte vermuten, daß eine kleine Stimulation im Bereich niedriger Antikörperkonzentrationen, die überdeckt wird durch eine Inhibition eine Verzögerung vortäuscht, was zu einer Parallelverschiebung der Kurve in bezug auf die 30S+50S-Kurve führt.

Die Divergenz beider Kurven könnte jedoch auch dadurch interpretiert werden, daß bei den 30S-Untereinheiten "labile"

Phe-tRNS-Bindung

Tab.4

Auswertung der Inhibitionsversuche der enzymatischen Phe-tRNS-Bindung durch FabI-Antikörper. (+ = Tendenz zur nächst höheren Klasse)

		Inhibitionsklasse				
		o	+	++	+++	++++
30S + 50S	NIS	S 1	S10	S 9	S 3	
	S 2	S 8+	S11+	S18		
	S 4	S13	S14	S21		
	S 5	S15	S19+			
	S 6		S20			
	S 7					
	S12					
	S16					
70S	NIS	S 3+	S 9			
	S 2	S10	S11			
	S 4	S14	S18+			
	S 8	S19+				
	S12	S20				
	S13	S21				

Strukturen vorliegen, die im 70S-Komplex "gefestigt" sind. Eine endgültige Klärung bedarf weiterer Experimente.

Additionsversuche

Abb.22 zeigt in der oberen Reihe die Inhibitionskurven der drei FabI-Präparationen gegen S2, S3 und S14. Alle Kombinationsexperimente wurden in einem Ansatz durchgeführt. Es wurde hier das schwächere der in Abb.23 gezeigten Anti-S3-Fab's verwendet. Aus diesen Kurven wurden die halben und die drittel Inhibitionswerte errechnet und miteinander zu Paaren bzw. Tripletts kombiniert. Das sind die in der unteren Reihe gestrichelt gezeichneten theoretischen Inhibitionskurven, wenn kein kooperativer Effekt auftreten würde. Die durch Kombination der Antikörper im Test gewonnenen Kurven sind darüber gezeichnet.

Die Kombination Anti-S2/Anti-S3 und Anti-S3/Anti-S14 ergaben Inhibitionen, die genau der errechneten Summe der einzelnen Inhibitionen entsprachen. Aber die Kombination Anti-S2/Anti-S14 zeigt eine signifikante Stimulierung, die auf Kooperativität schließen läßt oder den Schluß nahelegt, daß kompetitive Effekte eine Rolle spielen. Die Dreierkombination

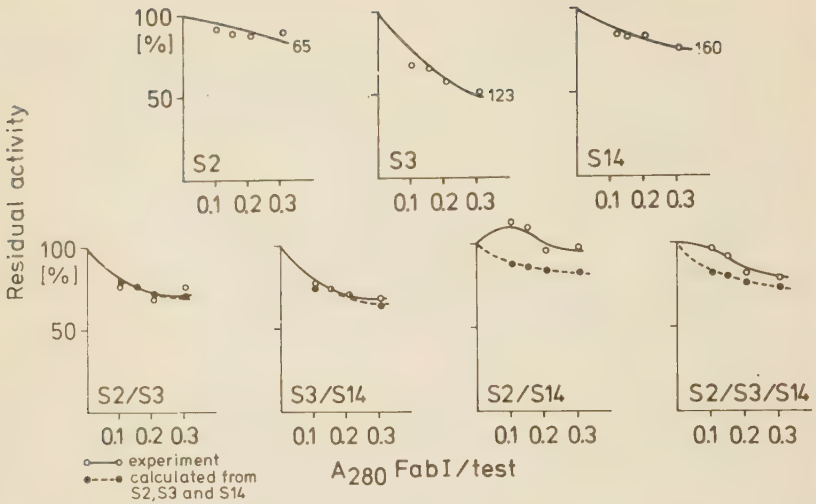


Abb. 22

Kombinationen von Anti-S2-, -S3- und -S14-Fab's im enzymatischen Phe-tRNS-Bindungsexperiment zur Untersuchung der Kooperativität. Erklärung im Text.

Anti-S2/Anti-S3/Anti-S14 zeigt auch diesen Effekt, allerdings um das "nicht-kooperative" Drittel (von S3) vermindert, was eher auf Konkurrenz hindeutet.

In einem zweiten Experiment wurde das stärkere der beiden Anti-S3-Fab's verwendet. Hier wurden keine Konzentrationsreihen ausgetestet, sondern einzelne Konzentrationen geprüft. Tabelle 5 zeigt das Ergebnis.

Phe-tRNS-Bindung			
Hinzugefügtes Fab I	Fab/30S (A ₂₈₀ /A ₂₆₀ Verhältnis)	% Inhibition	
		theoretisch	gemessen
Anti S2	0.6		30
Anti S3	0.2		10
Anti S14	0.47		15
Anti (S2+S3)	0.6+0.2	40	50
Anti (S2+S3+S14)	0.6+0.2+0.47	55	65

Tab. 5

Kombinationen von Anti-S2-, -S3- u. -S14-Fab's im enzymatischen Phe-tRNS-Bindungsexperiment zur Untersuchung der Kooperativität. Erklärung im Text.

Deutlich erkennt man hier einen kooperativen Effekt aller drei Proteine miteinander. Anders als im oben beschriebenen Experiment ist hier S3 an dem kooperativen Verhalten beteiligt.

Abgrenzung von spezifischen und unspezifischen Effekten

Die bei einigen Proteinen auftretenden Stimulierungen, die aus den Inhibitionskurven sichtbar werden, scheinen unspezifische Proteineffekte zu sein, da sie sich schwer quantitativ reproduzieren ließen. Qualitativ jedoch führte ein bestimmtes Protein entweder zu einer Inhibition oder einer Stimulation. Bei Nichtimmunseren trat der Effekt nie auf. Auch waren in diesem Zusammenhang Unterschiede zu verzeichnen, je nachdem, ob 30S- oder 70S-Ribosomen getestet wurden. Es ließen sich mehr 70S-Ribosom-FabI-Kombinationen stimulieren, als 30S-Ribosom-FabI-Kombinationen (siehe Seite 63). NIS-Seren inhibierten hier unspezifisch etwa 15 % bei maximaler Antikörperzugabe von 0,3 A₂₈₀ pro Test.

Individualspezifitäten verschiedener Antiseren

Auf die allgemeinen Bemerkungen über die Individualspezifitäten der Seren und Globuline auf den Seiten 52 ff wird hier verwiesen. Im besonderen fielen bei diesen Experimenten zwei ribosomale Proteine auf, die mit unterschiedlichen Antikörpern (FabI) unterschiedliche Ergebnisse zeigten. Es sind dies die Proteine S3 und S21 (Abb.21, Abb.22, Tab.5 und Abb.20). Bei den Anti-S3-Antikörpern sind es Fab_{116_{II}}DE₂^I und Fab₁₂₃^I, die sowohl bei der Bindung an die separate 30S-Untereinheit als auch bei der an das undissoziierte Ribosom unterschiedliche Inhibitionen verursachen (Abb.23).

Es besteht kein Zweifel darüber, daß beide Fab's an das Protein S3 binden (Poly-U, Abb.19), da das Ausmaß der Auswirkungen jedoch verschieden ist, muß gefolgert werden, daß die Bindungsorte unterschiedlich sind. Sie können getrennt voneinander, nebeneinander oder überlappend auf S3 liegen. Das würde auch das unterschiedliche Verhalten der beiden Anti-S3-Fab's

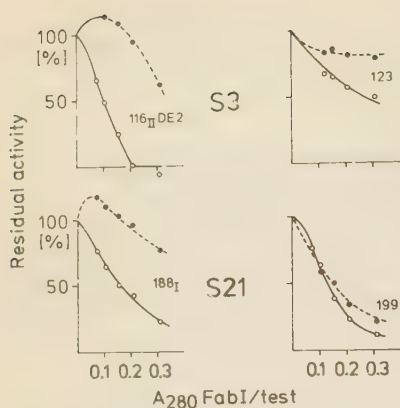


Abb. 23

Individualspezifitäten verschiedener Anti-S3- und Anti-S21-Seren bei der enzymatischen Phe-tRNA-Bindung an 30S+50S- (o—o) sowie 70S-Ribosomen (●—●). Erklärungen im Text. Es wurden auch hier FabI-Antikörper verwendet.

in den Additionsexperimenten erklären (Abb. 22, Tab. 5, Abb. 23).

Bei den beiden Anti-S21-Fab's handelt es sich um Fab₁₈₈^I und Fab₁₉₉^I, deren Inhibitionskurven sich im wesentlichen nur bei den 70S-Ribosomen unterscheiden. Diese Differenzen ließen sich wahrscheinlich korrigieren, wenn die Stimulation bei Fab₁₈₈^I eliminiert werden könnte. Das gilt auch für die übrigen erst stimulierenden Fab's.

Es taucht hier die Frage auf nach der Relevanz der Nichtinhibitoren (siehe Seite 40). Braucht man eine größere Anzahl von Seren gegen ein antigenes Protein, um definitiv einen Nichtefferkt zu konstatieren? Es sei hier auf die Diskussion verwiesen, nur soviel vorweg:

1. Zur Aufdeckung möglichst vieler Determinanten eines Proteins kann es grundsätzlich nur von Vorteil sein, wenn man möglichst viele Antiseren gegen dieses Protein hat.
2. Unterschiedliche Reaktionen in unterschiedlichen Systemen weisen Nichtinhibitoren des einen Systems dennoch als aktive Antikörper aus, die lediglich die Funktion des Systems, in dem sie als Nichtinhibitoren auftreten, nicht stören können, obwohl sie an das Protein gebunden haben.
3. Präzipitationsversuche mit 30S- und 70S-Ribosomen in Agar, in Zuckergradienten und bei analytischen Ultrazentrifugalläufen (C. Stöffler, R. Hasenbank, M. Lütgehaus, R. Maschler,

C.A.Morrison, H.Zeichhardt, R.A.Garrett, in Vorbereitung) zeigen bei den verwendeten Seren stets gute positive Ergebnisse, was die Akzessibilität der Proteine für die Antikörper betrifft.

Beeinflussung der Formation des f-Met-tRNS-IF2-30S-Initiationskomplexes durch Antikörperfragmente

In diesen Versuchen sollte der sehr spezifische Mechanismus der Initiation, d.h. der IF1-IF2-abhängigen Bindung einer f-Met-tRNS an den Komplex 30S-Ribosom-Poly-AUG, mit Hilfe der Antikörperfragmente gestört oder verhindert werden. Diese Reaktion ist in vielerlei Hinsicht von Bedeutung (s.Einleitung), u.a. muß hier das Ribosom in vivo zwischen zwei relativ ähnlichen tRNS-Molekülen unterscheiden (f-Met- und Met-tRNS).

Die Experimente, die in ihren Komponenten Größenverhältnisse wie bei den Phe-tRNS-Versuchen aufweisen (siehe Seite 60), wurden nur mit 30S-Untereinheiten durchgeführt, da die Initiation im Gegensatz zur Elongation von der großen Untereinheit unabhängig abläuft (s. Einleitung) (101,102)

Optimierung des Systems

Die Optimierung des Systems erfolgte entsprechend wie für Phe-tRNS auf Seite 61 beschrieben. Es wurde optimiert: IF1, IF2, Poly-AUG, ³H-f-Met-tRNS und die Inkubationszeit. Optimale Werte siehe Seite 37.

Die 30S-Untereinheiten waren limitierend in dem System, die Antikörperkonzentrationen entsprachen dem molaren Verhältnis FabI:30S-Ribosomen von 516:1.

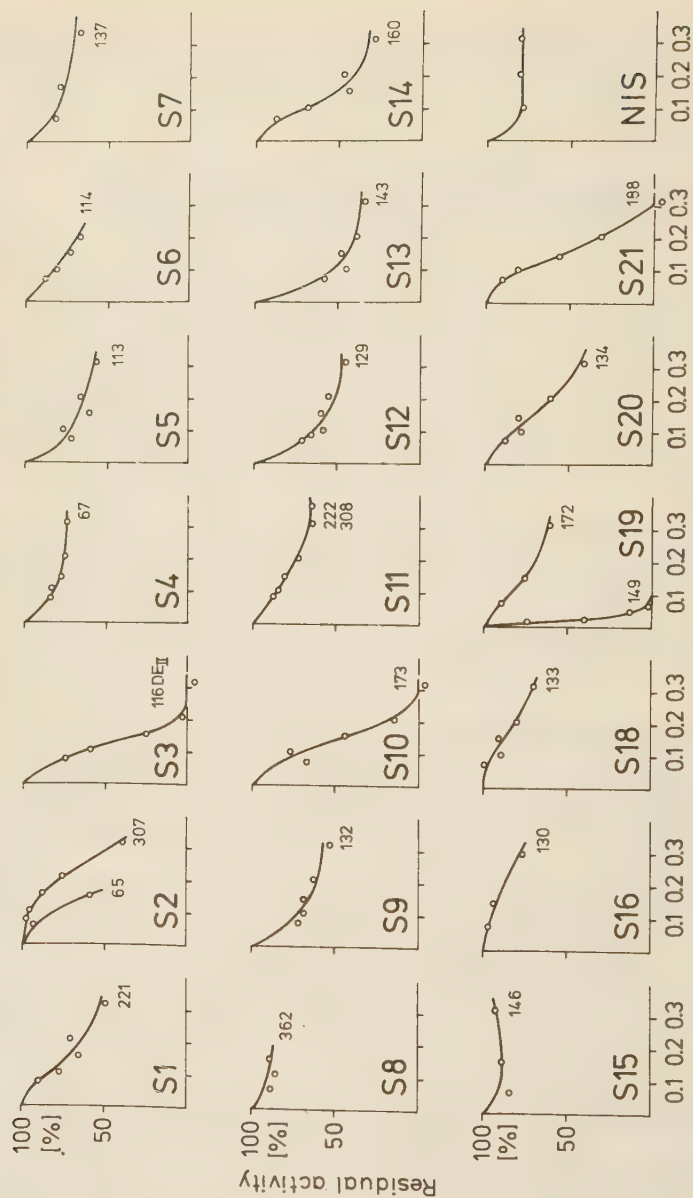
Auch hier wurden mit Ausnahme von S17 alle ribosomalen Proteine der kleinen Untereinheit geprüft.

Auswertung

Die Auswertung der Versuche erfolgte wiederum nach einer Abbildung.(Abb.24), in der alle Inhibitionen zusammengestellt sind.

Hier fallen vier Proteine auf, deren Inhibitionskurven auf eine sehr starke Wirkung der spezifischen Fab's schließen las-

Inhibition of Poly-AUG-directed f-Met-tRNA-binding



A280 Fab I / test

Legende zu Abb.24

Inhibitionen der IF2-abhängigen f-Met-tRNS-Bindung an ribosomale 30S-Untereinheiten durch Antikörperfragmente (FabI). Erklärung Legende Abb.21 und im Text.

sen, es sind S3, S10, S19 und S21.

Schwache Reaktionen des Systems wurden bei Verwendung der Nichtimmunseren sowie der Antikörper gegen folgende Proteine gemessen: S4, S8, S15 und S16. Es wurde nicht bei jeder Inhibitionskurve ein Plateau erreicht.

Ein Auswertungsschema, das den NIS-Bereich als nichtinhibitorisch (0) ausweist, diente auch hier zur Quantifizierung (Abb20). Danach ergibt sich für die schwachen Inhibitoren (+) folgende Aufstellung der Proteine: S1, S5, S6, S9, S11, S18, (S19). Mittelstark inhibitorische Fab's sind (++): Anti-S2, -S12, -S13, -S14, -S20.

Eine Aufstellung dieser Auswertung ist in Tabelle 6 zusammengestellt.

Tab.6

Auswertung der Inhibitionsversuche der enzymatischen f-Met-tRNS-Bindung durch FabI-Antikörper. (+=Tendenz zur nächst höheren, -=Tendenz zur nächst niedrigeren Inhibitionsklasse)

		f-Met-tRNS-Bindung					
		Inhibitionsklasse					
	0	+	++	+++	++++	+++++	
30S	NIS	S 1+	S 2		S 3	S19 ₄₉	
	S 4	S 5	S12-		S10		
	S 8	S 6+	S13		S21		
	S15	S 7-	S14				
	S16	S 9	S20				
		S11					
		S18					
		S19 ₁₇₂					

Hier sieht man, daß sich die Wirkungen der schwachen und mittleren inhibitorischen Antikörper deutlich von denen der sehr starken (++++ und +++) separieren. Stark (+++) die Funktion beeinflussende Fab's treten nicht auf.

Es wird hier auf die außerordentlich extreme Wirkung des Anti-S19-Fab₁₄₉I im Gegensatz zu dem schwachen Fab₁₇₂I hingewiesen.

Abgrenzung von spezifischen und unspezifischen Effekten

Die umfangreiche Gruppe der schwach wirkenden Antikörper (+) ist wohl mit Ausnahme des Anti-S1-Fab's, das in den mittleren Bereich tendiert, zu den Proteinen der NIS-Gruppe zu rechnen. Anti-S6 allerdings zeigt am ausgeprägtesten von allen eine lineare Inhibition ohne Plateau, so daß Sättigung wohl erst bei höheren Fab-Konzentrationen erreicht wird. Dennoch kann es im Vergleich zu den vier wirkungsvollsten Antikörpern wohl kaum als wesentlich angesehen werden.

Beeinflussung der Bindung von Spectinomycin (Spc) und Streptomycin (Sm) durch Antikörperfragmente

In diesen Experimenten kam es uns darauf an, etwas über die Interaktion der beiden Antibiotika Spectinomycin und Streptomycin mit dem bakteriellen Ribosom herauszufinden. Mit Hilfe der relativ großen spezifischen Fab's sollte versucht werden, die kleinen Moleküle Spc und Sm zu verdrängen oder bei der Bindung zu behindern.

Erwartet wurde von den Versuchen die Lokalisation der Bindungsorte der beiden Antibiotika am Ribosom. Um diesen für Spectinomycin zu bestimmen, wurde davon ausgegangen, daß dieses Aminoglycosid mit dem relativ kleinen Molekulargewicht von 332,4, bzw. bei dem verwendeten Dihydrospectinomycin von 334,4, theoretisch an fast jeden Oberflächenort des Ribosoms gelangen kann. Es ist sicherlich auch klein genug, um in das Ribosom etwas einzudringen. Von vornherein ist also nicht unbedingt zu erwarten, daß irgendein Antikörperfragment, durch seine großen Abmessungen behindert, gerade den Ort trifft, auf dem das Antibiotikum-Molekül sitzt. Ähnlich sieht es für Streptomycin aus (M=581,6 bzw. 583,6 für di-³H-Sm).

Unsere Methode, dies zu testen, bestand darin, 30S- und 70S-Ribosomen mit Antikörperfragmenten (FabI) vorzuinkubieren, um dann zu versuchen, das Antibiotikum zu binden. Die Inhibition im Vergleich zur Kontrolle gibt Aufschluß darüber, um wieviel der spez. Antikörper die Antibiotikumbindung ans Ribosom herabsetzt.

Zusätzlich wurden Versuche unternommen, in denen das

Aminoglykosid mit Ribosomen vorinkubiert wurde, um danach das FabI binden zu lassen. Gemessen wurde der Anteil des Antibiotikums, der durch den Antikörper von seiner Bindung verdrängt oder mehr gebunden wurde. Ähnlich wie bei den Phe-tRNS-Bindungsversuchen, erschien auch hier zusätzlich die Addition mehrerer positiver Fab's pro Test zur Prüfung auf Kooperativität von Interesse.

Optimierung des Systems (Spc und Sm)

1. Antikörperkonzentration: Das molare Verhältnis von di-³H-Spectinomycin zu Ribosomen lag bei 21,6 : 1, das von di-³H-Streptomycin zu Ribosomen bei 14,8 : 1. Die Verhältnisse wurden durch Konzentrationskurven ermittelt.

2. Antibiotika: Die spezifische Aktivität wurde mit $640 \cdot 10^3$ cpm (counts per minute = Zählimpulse pro Minute; cpm · Effizienz des Zählers = dpm, disintegrations per minute = Zerfälle pro Minute, 10^{-12} Ci = $1 \mu\text{Ci}$ = 2,22 dpm) pro Test so gewählt, daß noch ca. $6,2 \cdot 10^3$ cpm pro Test nach dem Filtern gezählt werden konnten. Die Effizienz des Szintillationszählers lag bei 50 % für Tritium, das entspricht für die Zählung des Filters einem Waschverlust von 99 %.

3. Inkubationszeit: Eine Kinetik ergab für Spc ein Plateau bei 20' Inkubationszeit. Die ebenso ermittelte Inkubationszeit für Sm betrug 35'.

Alle Komponenten wurden in TMAI-Puffer gelöst oder gegen diesen dialysiert. Eventuell auftretende Trübungen der Fab's beim Lösen wurden abzentrifugiert, danach erfolgte die Einstellung der Konzentration.

Um den Fall auszuschließen, daß ein Antibiotikum an ribosomale RNS bindet, wurden die Experimente statt mit Ribosomen mit einem Gemisch von 16S + 23S-rRNS durchgeführt [†]). Es ergaben sich keine Hinweise darauf, daß rRNS mit Spectinomycin oder Streptomycin unter diesen Bedingungen interagiert.

Auswertung (Spc)

Wenn man bei der Auswertung nach dem gleichen Prinzip verfährt, wie bei den vorigen Experimenten, so fällt zunächst

[†]) Die isolierte rRNS stellte freundlicherweise Herr Dr. R.Garrett zur Verfügung.

auf, daß kein Antikörper eine 100%ige Inhibition verursacht. Betrachtet man erst einmal die Inhibitionen der ribosomalen 30S-Untereinheiten (Abb.25) und vergleicht sie mit einem willkürlichen Klassifikationsschema (Abb.20), das auf die Inhibition der Spc-Experimente abgestellt ist (Abb.25), so ergibt sich, daß nur wenige mittlere bis starke Inhibitoren existieren (Tab.7). Es sind dies Anti-S1, -S8, (-S10), -S18, -S20.

Spc-Bindung

	o	Inhibitionsklasse				
		+	++	+++	++++	
30S	NIS	S 2+	S 8	S 1-		
	S 4	S 3+	S10-			
	S 5	S 6	S18			
	S 9	S 7-	S20			
	S13	S11-				
	S14	S12-				
	S15	S19				
	S16	S21				
70S	NIS	S 2	S 3	S 1		
	S 4	S 8	S 6	S10		
	S 5	S15	S19	S18		
				S20		
				S21		

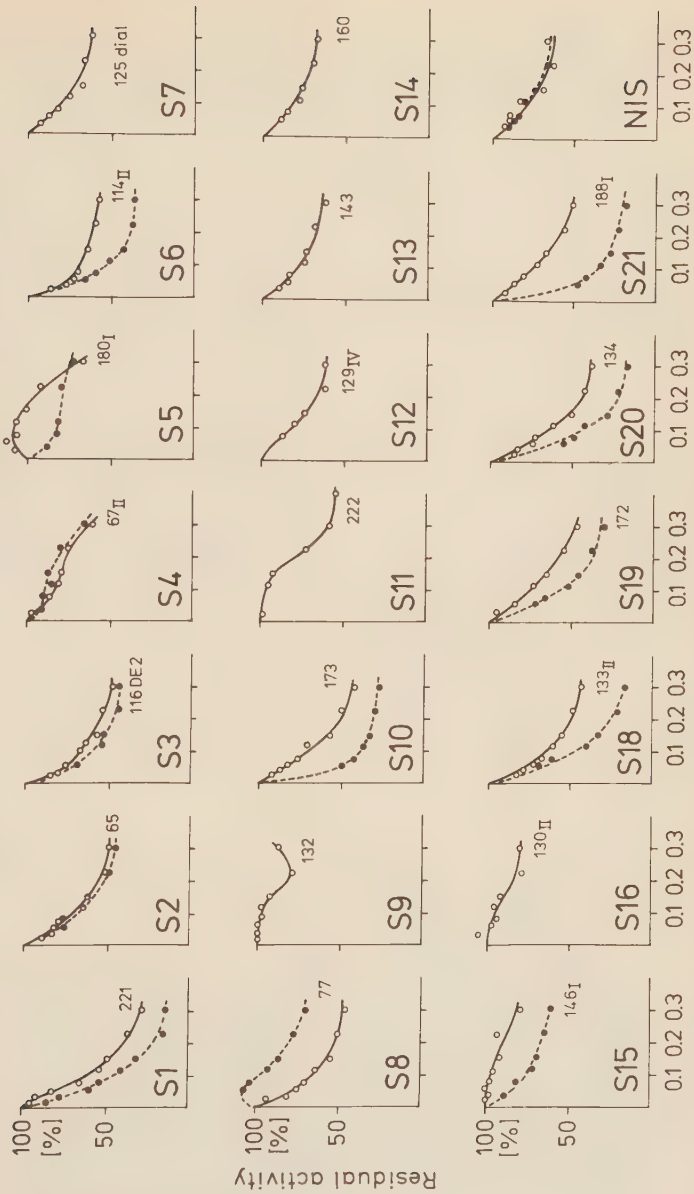
Tab.7

Auswertung der Inhibitionsversuche der Spectinomycinbindung an das Ribosom durch FabI-Antikörper. (+=Tendenz zur nächst höheren, -= Tendenz zur nächst niedrigeren Inhibitionsklasse)

Eventuell kann man zu dieser Gruppe noch Anti-S2 und Anti-S3 zählen. Schwache Inhibitoren sind die Fab's gegen die Proteine S2, S3, S6, S7, S11, S12, S19, S21. Hier fallen die Inhibitoren der Proteine S7, S11 und S12 in den Grenzbereich zu den Nichtinhibitoren, zu denen sie vielleicht tatsächlich gehören. Zusammenfassend haben folgende Proteine auf die Bindung von Spectinomycin einen inhibitorischen Einfluß, wenn sie der Wirkung spezifischer Fab's ausgesetzt werden: S1, S2, S3, S6, S8, S10, S18, S19, S20, S21.

Inhibitionsexperimente für 70S-Ribosomen wurden nur in den Fällen gemacht, wo sich eine Inhibition bei den 30S-Untereinheiten ergeben hatte oder das Protein ein interessanter Kandidat im Sinne der in der Einleitung erwähnten genetischen Aspekte war. Bei Verwendung von 70S-Ribosomen sind die stärk-

FabI-induced Inhibition of Spc-binding



○ 30S Ribosomes
● 70S

A280 FabI/test

Abb.25 Legende siehe Seite 76

Legende zu Abb.25

Inhibitionen der di- ^3H -Spectinomycin-Bindung an 30S- (o—o) und 70S-Ribosomen (●---●) im Filterexperiment. Darstellung wie bei Abb.21. Erklärungen im Text.

sten Fab's gegen die Proteine S1, S10, S18, S20 und S21 gerichtet. Weniger stark werden die Proteine S3, S6 und S19 angegriffen. Eine nur schwache Inhibition zeigt sich bei S2, S8 und S15. S5 ist auch hier nicht in der Gruppe der Proteine, die durch Binden des Fab's die Spectinomycinbindung beeinflussen. (Abb.26)

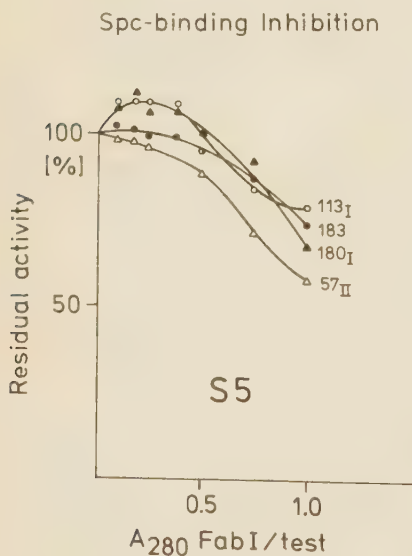


Abb.26

Individualspezifitäten der Anti-S5-Immunglobuline (FabI). Die Bindung von Spectinomycin an die 30S-Untereinheiten wird hier kaum beeinflußt (s. Text).

In der Regel ist es hier so, daß der Effekt der Antikörper auf das 70S-Ribosom stets etwas größer ist, als auf die Untereinheit. Diese Differenz mag in dem Bereich um 15 % an der Meßgenauigkeit des Systems liegen oder es besteht von Anfang an ein Differenzfaktor, z.B. bei der Berechnung der Ribosomenkonzentration der 70S- und 30S-Ribosomen. Die 70S-Ribosomen werden stärker als die 30S-Untereinheiten inhibiert, wenn die Proteine S6, S18, S20 und S21 angegriffen werden. Es sollte

in diesem Falle weiter untersucht werden, ob der 5oS-Untereinheit nach dem Prinzip der Rückkoppelung eine Vermittlerrolle bei der Inhibition zufällt.

Ein einziger Fall zeigt die Umkehrung dieses Prinzips: Anti-S8-FabI hat eine stärkere Wirkung auf die kleine Untereinheit, als auf das 7oS-Ribosom. Selbst wenn man die störende Stimulierung transformiert, bleibt eine Differenz von ca. +10 % für die 7oS-Untereinheit.

Die schon im Phe-tRNS-Experiment angewendete Additions- methode zur Ermittlung kooperativer Proteine wurde hier für Spectinomycin mit den Proteinen S1, S19, S20 und S21 in folgenden Kombinationen durchgeführt, wobei die Einzelkonzentrationen wie im Phe-tRNS-Bindungstest zur Gesamtkonzentration kombiniert wurden. Jede mögliche Kombination wurde getestet: Solo: S1, S19, S20, S21, Duplets: S1/S19, S1/S20, S1/S21, S19/S20, S19/S21, S20/S21, Tripletts: S1/S19/S20, S1/S19/S21 S1/S20/S21, S19/S20/S21, Quadruplett : S1/S19/S20/S21. Für jede Kombination wurde eine Konzentrationskurve wie bei den bisherigen Versuchen getestet.

In keinem Falle ergab sich ein kooperativer Effekt. Die Inhibitionen entsprachen den errechneten Werten.

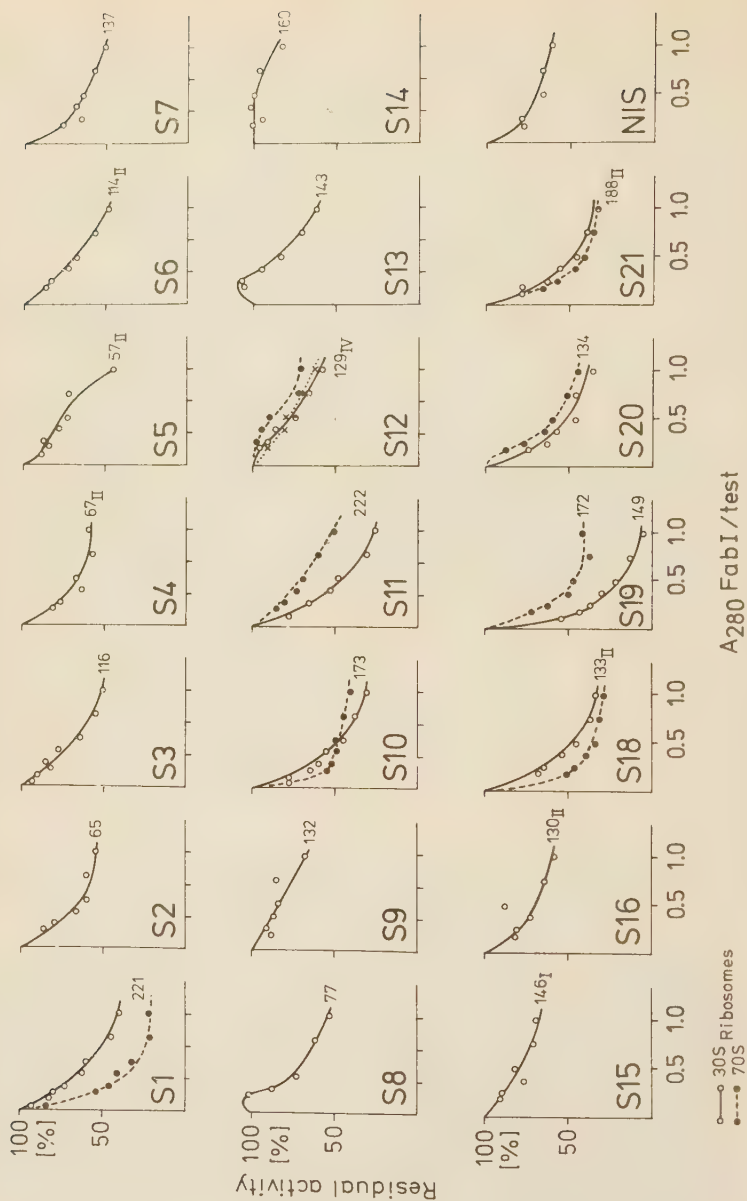
Die Experimente mit praeinkubierten Ribosomen und Antibiotika werden bei der Auswertung der Sm-Versuche besprochen.

Auswertung (Sm)

Bei der Auswertung dieser Experimente (Abb.27) wurde wiederum ein dem System angepaßtes Klassifikationsschema (Abb. 20) zugrunde gelegt, das sich am NIS orientiert.

Tabelle 8 zeigt als stärkste Inhibitoren (++++ und +++) die Fab's Anti-S19, -S10, -S11, -S18 und evtl. -S21 bei den 3oS-Untereinheiten und Anti-S1, -S18 und evtl. -S21 bei den 7oS-Ribosomen. Mitteilstarke Inhibitionen (++) werden durch folgende Proteine induziert: S1, S5 (?), S6, S20, S21 (3oS) und S10, S11, S19, S20, S21 (7oS). S5 zeigt ein abnormes Verhalten, was die Inhibitionskurve betrifft, zumindest ist bis zu einer Konzentration von $1,0 \text{ A}_{280}^{\text{Fab/Test}}$ noch kein Inhibitionsplateau zu erkennen.

FabI-induced Inhibition of Sm-binding



A280 FabI/test

Legende zu Abb.27

Inhibitionen der di- ^3H -Streptomycin-Bindung an 30S- (o—o) und 70S-Ribosomen (●---●) im Filterexperiment. Darstellung wie bei Abb.21. Erklärungen im Text.

Sm-Bindung

		Inhibitionsklasse				
		o	+	++	+++	++++
30S	NIS		S 2	S 1	S10	S19
	S 9		S 3	S 5?	S11	
	S13+		S 4	S 6	S18-	
	S14		S 7	S20		
	S15		S 8	S21+		
			S12-			
70S			S16-			
	NIS			S10	S 1+	
	S12			S11	S18	
				S19		
				S20		
				S21+		

Tabelle 8

Auswertung der Inhibitionsversuche der Streptomycin-Bindung an das Ribosom durch FabI-Antikörper. (+ = Tendenz zur nächst höheren, - = Tendenz zur nächst niedrigeren Inhibitionsklasse)

Zu den schwachen Inhibitoren zählen: Anti-S2, -S3, -S4, -S7, -S8, -S12 (!) und -S16, wobei S12 und S16 auf der Grenze zu den Nichtinhibitoren stehen. Auch hier ist also das Genprodukt S12 nicht besonders hervorgetreten.

Die schwächeren Inhibitionen der 70S-Ribosomen i.G. zu den 30S-Untereinheiten bei den Proteinen S11 und S19 werden in der Diskussion untersucht.

Es wurde, wie erwähnt, auch der Versuch unternommen, sowohl Streptomycin als auch Spectinomycin an 70S-Ribosomen vorzubinden, um dann den spezifischen Antikörper einzusetzen. Es inkubierten dabei 70S-Ribosomen und Antibiotikum 30' bei 35°C vor. Die Ribosomen wurden, wie stets durch Vorinkubation aktiviert, bevor sie zu dem Antibiotikum gegeben wurden. Nach der Präinkubation des Aminoglycosids mit den Ribosomen wurden Fab's zugegeben und nach weiteren 5' erfolgten wie beschrieben Filtern, Trocknen und Zählen der Proben.

Tabelle 9 zeigt die Verhältnisse für Sm (links) und Spc

Inhibitionen in $\Delta\%$

Protein	Sm 70S		Spc 70S	
	1.0 A280	0.5 A280	1.0 A280	0.5 A280
S 1	-15		-6	-16
S 5			0	-4
S 10	+11		-20	-24
S 11	-7	+8		
S 12	-1	+15		
S 14	+26	+32		
S 15			-9	-19
S 18	-4		-36	-52
S 19	-3	-4	-48	-63
S 20	+9	+10	-18	-10
S 21	-9	-1	-14	-19

Tab.9

Präinkubation von Streptomycin und Spectinomycin bzw. FabI-Antikörpern mit 70S-Ribosomen vor dem Bindungsexperiment. Die Inhibitionsdifferenz, die hier (in bezug zu dem normalen Versuch) auftritt, ist für zwei Fab-Konzentrationen aufgeführt. Weitere Erläuterungen im Text.

(rechts). Angegeben sind die Prozent-Differenzen, die sich ergeben, wenn man die Inhibition mit dem vorgebundenen Fab von der Inhibition mit dem vorgebundenen Antibiotikum subtrahiert. Das heißt, ein positiver Wert bedeutet Verringerung des gebundenen Antibiotikums, wenn dieses vorgebunden war, ein negativer Wert heißt, es ist mehr Antibiotikum an den Ribosomen, wenn dieses vorgebunden wird.

Bei Sm fällt S14 signifikant aus dem Rahmen. Obwohl in der Gruppe der Nichthemmer, wird das Antibiotikum teilweise durch den Antikörper nachträglich wieder verdrängt.

Bei den Spc-Experimenten tritt so ein Fall bei den untersuchten Proteinen nicht auf. Hier zeigt sich, daß bei den Fab's Anti-S10, -S18 und -S19 das nachgebundene Fab das Spectinomycin nicht mehr verdrängen kann. Wird das Fab vorgebunden, so verhindert es, daß das Antibiotikum bindet.

Topographie des Ribosoms, Problem, Ergebnisse und Diskussion

Wenn von Topographie des Ribosoms gesprochen werden soll, so ist damit das Oberflächenproblem dieses Vielkomponentensystems gemeint. Es ist für das Verständnis der Funktion auf molekularer Basis dieses Organells wichtig, das Arrangement der drei Nukleinsäuren und der etwa 54 einzelnen Proteine zu kennen. Da die ribosomalen Untereinheiten in sich relativ abgeschlossen erscheinen (auf das Problem der Interaktion der 30S- und der 50S-Untereinheit wird im folgenden noch eingegangen), und weil das 70S-Ribosom einen sehr hohen Grad an Komplexität aufweist, lag es nahe, zunächst nur die kleine Untereinheit zu untersuchen. Aus mehreren Gründen sind röntgenkristallographische Untersuchungen über die Anfangsstadien noch nicht hinweggekommen. Auf andere Methoden wird in der Diskussion eingegangen.

Unsere Methode bestand darin, eine indirekte Messung, nämlich die durch Interaktion eines spezifischen IgG- oder Fab-Moleküls mit seinem Antigen (ribosomales Protein) hervorgerufene Störung einer oder mehrerer Funktionen, durchzuführen. Auch bereits ein kleiner reproduzierbarer Einfluß, der über die Wirkung eines Nichtimmunserums hinausgeht, steht als Indiz für die Angreifbarkeit des spezifischen ribosomalen Proteins durch Antikörper. Damit ist gleichzeitig unter Berücksichtigung der Größe der Antikörper gezeigt, daß dieses Protein mindestens mit einer Determinante an der Oberfläche erscheint.

Die Zugänglichkeit der einzelnen Proteine der 30S-Untereinheit für Antikörper

Will man einen Überblick darüber haben, wieviel Fab's überhaupt auf einem Ribosom Platz haben, wenn sie dicht gepackt ohne Fehlstellen auf der Oberfläche des Ribosoms sitzen, so kann man das grob überschlagen. Es wird dabei angenommen, daß der komplette Antikörper etwa die in der Einleitung gezeigte T-Form aufweist und folgende Maße hat (103,99). Der Querbalken ist ca. 140 Å lang und ca. 40x50 Å dick, der aufrechte Balken ist etwa 60 - 70 Å lang und 38x45 Å dick. Ein Fab hätte also etwa die Abmessungen 40 Å x 50 Å x 70 Å. Liegt die Bin-

dungsstelle des Fab's am Ende des Querbalkens (99,104), so kann man vereinfachend mit einem Quadrat von $40 \times 40 \text{ \AA}$ rechnen, hier entspricht die Kantenlänge etwa der Länge einer antigenen Determinante (76). Die das Antigen und seine Umgebung abdeckende Fläche wäre dann $1600 \text{ \AA}^2$ groß, wobei die kleinste antigene Determinante nur etwa die Größe $27 \times 17 \times 6,5 \text{ \AA}$ hat (75,76).

Für die Ribosomen wurden folgende Abmessungen angenommen (165): $30\text{S} : r_1 = 27,5 \text{ \AA}, r_2 = 110 \text{ \AA}, r_3 = 110 \text{ \AA}, F_{\text{Ellipsoid}} = 86\,250 \text{ \AA}^2$, $50\text{S} : r_1 = 80 \text{ \AA}, r_2 = 115 \text{ \AA}, r_3 = 115 \text{ \AA}, F_E = 134\,600 \text{ \AA}^2$. Es ergibt sich nun folgendes Bild:

$$1. \frac{F(30\text{S})}{F(\text{Fab})} = 54 \qquad 2. \frac{F(50\text{S})}{F(\text{Fab})} = 84$$

Die relativ niedrige Zahl von etwa 54 Fab's/30S-Ribosom erscheint noch ziemlich hoch gegriffen, wenn man bei einem Anti-30S-Serum annimmt, daß sterische Behinderung auftritt und dadurch nicht alle spezifischen Antikörper binden können. Untersuchungen des Präzipitationsverhaltens verschiedener Proteinantigene mit unterschiedlichem Molekulargewicht (158) und von Ribosomen mit Antikörpern jedoch zeigen Werte in guter Übereinstimmung mit diesem Überschlag (H. Zeichhardt, pers. Mitteilung).

Für eine spezifische Antikörperpräparation wird jedoch nur der Antikörper an das Ribosom binden können, dessen Assoziationskonstante für eine freiliegende Determinante am höchsten ist (siehe Seite 15). Das bedeutet, daß überlappende Determinanten, je nach Vorhandensein von verschiedenen Fab's mit unterschiedlicher Affinität besetzt werden können, jedoch jeweils nur ein Antikörper zur Zeit. Dieser schon in der Einleitung erwähnte Fall wird mit Konkurrenz konkurrierender Antikörper bezeichnet.

Die Fähigkeit eines Fab's, in das Ribosom einzudringen, erscheint sehr gering, bedenkt man, daß nicht einmal Saccharose in dasselbe einzudringen vermag.

Der Bereich zwischen den beiden Untereinheiten - "interface" genannt - stellt einen Antikörper diskriminierenden Bereich dar. Antikörper, die hier bei den Untereinheiten binden,

sollten bei nicht dissoziierten Ribosomen keinen oder nur geringen Effekt hervorrufen.

Hervorgerufen durch seine große Anheftungsfläche, wird ein Fab stets auch dann Wirkungen auf das Ribosom ausüben, wenn es nicht einmal direkt eine wichtige Funktion ausschaltet. Die sterische Behinderung kann sich auch auf die unmittelbare Umgebung des Ribosoms inhibitorisch auswirken. Hier ist anzunehmen, daß der Grad einer Inhibition unmittelbar mit der Entfernung des Fab's von einem aktiven Zentrum korreliert, da im Gegensatz zum IgG kein freies Fab und kein Fc vom Molekül absteht.

Elektronenmikroskopisch scheint sich der Antikörper und sein Fragment so zu verhalten (105).

Die Zugänglichkeit (accessibility) der Proteine der 30S-Untereinheit für Antikörper wird in einer Arbeit von Stöffler et al. (G.Stöffler, R.Hasenbank, M.Lütgehaus, R.Maschler, C.A.Morrison, H.Zeichhardt und R.A.Garrett, in Vorbereitung) demonstriert. Es wurden dabei radioaktiv markierte Ribosomen mit IgG-Präparationen gegen Einzelproteine inkubiert und danach in einem Saccharose-Dichtegradienten zentrifugiert. Die radioaktiven Peaks wurden gezählt und die optischen Gipfel gemessen. In ähnlichen Experimenten mit 50S-Untereinheiten (Stöffler, pers. Mitteilung), gibt es einige wenige Antikörper, welche nicht an die 50S-Untereinheit zu binden scheinen. Im großen und ganzen sind aber auch in der 50S-Untereinheit die meisten Proteine akzessibel für Antikörper-Bindung.

In derselben Arbeit wurden analytische Ultrazentrifugationen von mit IgG- oder Fab-Präparationen inkubierten 70S-Ribosomen beschrieben, die mit Ausnahme von S19 dasselbe Verhalten zeigten.

Mit einer rein immunologischen Methode, der "Sandwich"-Technik erfolgte ebenfalls ein Test auf Zugänglichkeit der ribosomalen Proteine. Hier wurde so verfahren, daß die radioaktiv markierten dissoziierten Ribosomen mit einer Anti-ProteinX-Kaninchen-IgG-Präparation ^{x)} inkubiert (0°C) wurden. Anschließend wurde mit Anti-Kaninchen-IgG vom Schaf bei 30°C inkubiert. Das Präzipitat wurde nach dem Waschen gelöst,

^{x)} X = ribosomales Protein

PCA-gefüllt, gefiltert und in einem Szintillationszähler gemessen. Alle 21S-Proteine waren den Antikörpern auch hier zugänglich.

Der inhibitorische Effekt der Antikörper auf ein so komplexes System wie das Ribosom

Wie schon wiederholt betont, kann bei dem komplexen ribosomalen System mit den relativ großen Antikörpern oder deren Fragmenten in bezug auf eine Funktion nur dann eine relativ sichere Aussage gemacht werden, wenn in mehreren funktionellen Systemen unterschiedliche Reaktionen erfolgen. Für das Protein S9 kann man das gut belegen. Anti-S9-Fab inhibiert im

Protein	Poly U	Phe-tRNS		f-Met	Spc		Sm	
		30S	70S		30S	70S	30S	70S
NIS	0	0	0	0	0	0	0	0
S 1	2	1		1	3 -	3	2	3+
S 2	2	0	0	2	1+	1	1	
S 3	2 3 _{DE}	4	1+	4	1+	2	1	
S 4	2	0	0	0+	0	0	1	
S 5	2	0		1	0	0	2?	
S 6	1	0		1+	1	2	2	
S 7	1	0		1-	1-		1	
S 8	2	1+	0	0	2	1	1	
S 9	4	3	2	1	0		0	
S10	3	2	1	4	2 -	3	3	2
S11	4	2+	2	1	1-		3	2
S12	1	0	0	2-	1-		1 -	0
S13	3	1	0	2	0		0+	
S14	3	2	1	2	0		0	
S15	1	1		0	0	1	0	
S16	1	0		0	0		1-	
S17	-	-	-	-	-	-	-	-
S18	3	3	2+	1	2	3	3-	3
S19	3	2+	1+	1 ₁₇₂ 5 ₁₄₉	1	2	4	2
S20	3	2	1	2	2	3	2	2
S 21	3	3	1 -	4	1	3	2+	2+

Tab.10

Vergleich der in dieser Arbeit dargestellten Inhibitionsexperimente. Die Stärke der Inhibitionen ist durch die Ziffern 0 - 5 ausgedrückt. (+ und - bezeichnen die stärkere oder schwächere Tendenz)

zellfreien Poly-Phe-System sehr stark. Im Phe-tRNS-Bindungs-experiment ist die Inhibition stark, im Initiationsablauf nur schwach. Weder im Spc- noch im Sm-Experiment zeigt sich irgendein Effekt.

Alle Proteine der 30S-Untereinheit sind Antikörpern zugänglich

Vergleicht man die bisher aufgeführten Daten der verschiedenen Experimente dieser Arbeit (Tab.10), so sieht man, daß kein Protein ein negatives Resultat über alle Funktionen aufweist. Das bedeutet nach den oben angeführten Kriterien, daß jedes der 30S-Proteine (S17 nicht getestet) von außen, das heißt von der Oberfläche her, zugänglich für Antikörper ist.

Diskussion

Wie kann der Nachweis der Beteiligung eines einzelnen ribosomalen Proteins an bestimmten Funktionen des Ribosoms erbracht werden?

Die zweifellos idealste Methode wäre der Blick auf und in das Ribosom. Da das bislang nicht möglich ist, werden sehr verschiedene Anstrengungen unternommen, auf indirektem Wege etwas über die Korrelation, Struktur und Funktion zu eruieren.

Rekonstitution

Nachdem es gelungen war, die Ribosomen in ihre Bestandteile zu zerlegen, lag es nahe, eine in vitro Rekonstitution zu versuchen. Über die partielle Rekonstitution mit sogenannten "core"-Partikeln und "split"-Proteinen, eine beim CsCl-Waschen übriggebliebene Gruppe von Proteinen, das "core", sowie die abgespaltenen (split) Proteine (106, 107, 108, 109, 110, 111), kam man zur totalen Rekonstitution der 30S-Untereinheit von E. coli-Ribosomen (112, 113). Die aus 21 einzelnen Proteinen und der 16S-rRNS rekonstituierten Partikel waren physikalisch und funktionell 30S-Untereinheiten. Die Rekonstitution von 50S-Partikeln erbrachte bislang bei E. coli nur Untereinheiten, die physikalisch mit nativen 50S-Partikeln vergleichbar waren.

Nomura et al. (112, 113) nutzten die Möglichkeit der 30S-Rekonstitution, um durch Weglassen je eines Proteins und Testen auf unterschiedliche Funktionen, die Beteiligung dieses Proteins an der Funktion des Partikels nachzuweisen. Man erschloß auf diese Weise zwei Gruppen von Proteinen, solche, die weggelassen werden können, ohne die Rekonstitution zu stören, bei der Funktion der Ribosomen aber mehr oder weniger zu Ausfällen führten, und solche, die absolut für die physikalische Rekonstitution notwendig sind (assembly-proteins).

Da im Ribosom ein hohes Maß an Kooperativität der Proteine vorliegt, sind diese Versuche jedoch für den Test auf eine Funktionsbeteiligung einzelner Proteine nicht sehr geeignet.

Additionsversuche

Kurland et al. (16) haben gezeigt, daß es möglich ist, inaktive Ribosomen durch Hinzufügen exogener 30S-Proteine unter Rekonstitutionsbedingungen zu aktivieren.

Auf diese Weise fand man heraus, daß Addition von S1 zu einer konzentrationsabhängigen Stimulierung der Poly-U-Bindung führt (20). Wie schon bei den Additionsexperimenten der Phe-tRNS-Bindungsversuche erwähnt, fanden Randall-Hazelbauer und Kurland (22), daß die Proteine S2, S3 und S14 kooperativ die EF-T-abhängige aa-tRNS-Bindung an das Ribosom stimulieren. Eine Stimulierung wurde auch für die enzymatische Bindung von f-Met-tRNS gefunden. Diese drei Proteine wurden schon früher (114) in der Gruppe der 30S-"split"-Proteine gefunden.

Leider limitiert bei dieser Art der Versuche die Heterogenität (s. Einleitung) die Auswertung. Unterscheidet man jedoch nicht zwischen funktionellen und "assembly"-Proteinen, so läßt sich ermitteln, welche Proteine Struktur- und welche Funktionsproteine sind.

Chemische Modifikation

Kontrolliert chemisch modifizierte Proteine, die durch Rekonstitution wieder in den Verband des Ribosoms gebracht werden, haben eine große Chance, eine führende Rolle in der Aufschlüsselung der Funktion des Ribosoms zu spielen. Es wurde gezeigt, daß die mit Tetranitromethan modifizierten Proteine S11 und S21 nach Rekonstitution dem Ribosom die Fähigkeit Phe-tRNS zu binden, genommen hatten (115,116).

Diese Rekonstitution mit chemisch modifizierten Einzelproteinen, ist der immunologischen Methode sicherlich überlegen, da die Veränderung am Proteinmolekül sehr klein sein kann und damit eine unspezifische Störung, wie sie bei der Größe der Antikörper auftreten kann, so gut wie ausgeschlossen scheint. Leider gibt es auf Grund von technischen Schwierigkeiten bisher sehr wenige Ergebnisse.

Antikörpermethode

Die Fähigkeit der Antikörper, Antigene zu präzipitieren,

wurde schon sehr früh erkannt. Schon zu einer Zeit, als man nur sehr vage Vorstellungen von molekularen Strukturen hatte, setzte man Antikörper ein, um Antigene zu präzipitieren. Diese klassische Methode ist inzwischen sehr verfeinert worden und es sind eine Reihe anderer Methoden dazugekommen. Es sind hier zu nennen die Verkuppelung des Eisenspeicherproteins Ferritin mit Antikörpern zur elektronendichten Markierung elektronenmikroskopisch schwer auflösbarer Strukturen; die tracer-Methode, die ^{125}J (117) oder ^{131}J (118) zur Markierung der Antikörper verwendet. Eine sehr elegante Methode besteht darin, Antikörperhybride mit unterschiedlicher Spezifität zu schaffen oder trägergebundene Antikörper zu verwenden (Affinitätschromatographie).

Die Anwendung spezifischer Antiseren gegen ganze Ribosomen und ein Gemisch ribosomaler Proteine wurde bereits in anderen Instituten begonnen (119,120,121,122). Logische Folge waren Struktur- und Funktionsuntersuchungen mit spezifischen Antiseren gegen einzelne ribosomale Proteine (27,71,87, 123,124,125,126).

Allgemeine Limitationen

Limitationen für die Experimente dieser Arbeit waren in erster Linie die Größe des Antikörpers (99), sowie seine Bivalenz, die durch Anwendung von Papainfragmenten zu verringern versucht wurden. Durch die enzymatische Spaltung von 7S-Antikörpern mit Papain wurde zwar das Molekulargewicht um $\frac{2}{3}$ gesenkt, die Fragmente sind jedoch im Vergleich zu Ribosomen, aa-tRNA-Molekülen und Faktoren immer noch sehr groß. Besonders ungünstig ist das Größenverhältnis bei den Antibiotika Spectinomycin und Streptomycin. Ein schon diskutierter Vorteil ist die Monovalenz der Fragmente. Der in Material und Methoden beschriebene Ausfall der FabII-Fraktion stellte einen weiteren Limitationsfaktor dar, der in seiner Auswirkung auf die Gesamtavidität des Serums schwer zu überschauen ist.

Nichtunterscheidbarkeit von allosterischen und direkten Wirkungen

Es besteht hinreichende Evidenz anzunehmen, daß es bei der Bindung eines Antigens an den spezifischen Antikörper zu Kon-

formationsänderungen sowohl im Antigen als auch im Antikörper kommt (167). Außerdem vermag ein spezifischer Antikörper auch allosterische Effekte in einem Antigenprotein zu erzielen (167,127). So stimulieren z.B. spezifische Antikörper eine mutationsbedingt inaktive β -Galaktosidase (128). Bei Ribosomen zeigen die bisherigen Ergebnisse, daß es oft nicht möglich ist, zu unterscheiden zwischen Kooperativität der ribosomalen Proteine und allosterischem Einfluß der Antikörper.

Gesamtantikörper eines Tieres und spezifische Antikörper

Wie schon in der Einleitung erwähnt, enthält die 7S-Fraktion der Antikörper eines Hyperimmunserums etwa 1 - 3% spezifische Antikörper. Der hohe Anteil unspezifischer Proteine im Experiment kann sich störend auswirken. Eine Möglichkeit, diesen Anteil zu reduzieren, ist die Anreicherung spezifischer Antikörper. Dies ist in dieser Arbeit für die chromatographische Anreicherung beschrieben, jedoch besteht die Möglichkeit, durch aufwendige Affinitätschromatographie mit trägergebundenem Antigen rein spezifische Antikörper zu produzieren, die in sehr kleinen Mengen den Experimenten zugegeben werden können. Diese rein spezifischen Antikörper wären z.B. bei den hier aufgeführten Antibiotikaexperimenten das Mittel der Wahl, um die hohen unspezifischen Effekte zu eliminieren.

Diskussion der Ergebnisse

Hier soll anhand der Ergebnisse dieser Arbeit und der Befunde anderer Laboratorien eine Beteiligung der einzelnen Proteine der 30S-Untereinheit an der Funktion des Ribosoms in vitro diskutiert werden. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Testserien ist in Tab.10 zu finden. Es werden hier nur noch die mit Antikörperfragmenten (Fab) erzielten Ergebnisse verglichen.

S1: Das größte der ribosomalen Proteine der kleinen Untereinheit ist S1 mit einem Molekulargewicht von 68 000 Dalton (s. Einleitung). Nach Befunden von Voynow und Kurland (17) sowie Weber (19) enthalten die Ribosomen nur etwa 0,3 Kopien des

S1, d.h. in etwa nur jedem dritten Ribosom ist S1 vorhanden. Van Duin und Kurland (20) fanden, daß unter Rekonstitutionsbedingungen hinzugefügtes S1 die Poly-U-Bindung an das Ribosom erhöht, was auf eine Verschiebung der Heterogenität hindeutet.

Zu unseren Versuchen ist folgendes zu bemerken: Geht man von der Annahme aus, daß nur ein S1-enthaltendes Partikel funktionell in der Beziehung aktiv ist, daß es Polyuridylsäure binden kann, so ist die Funktion des gesamten in vitro-Systems nur abhängig von dem Drittel Ribosomen, das S1 enthält. Damit steigt jedoch hier die relative Antikörperkonzentration im Vergleich zu den "unit"-Proteinen um das Dreifache. Ein zweiter Punkt ist hier wie auch bei den übrigen Proteinen mit einzubeziehen: Ribosomenpräparationen enthalten nur einen bestimmten, schwer abschätzbaren Gehalt an aktiven Ribosomen. Ein großer Teil der nichtaktiven Ribosomen hat sicherlich bestimmte "fractional"-Proteine nicht, ein anderer Teil jedoch kann sie haben, ist aber durch die Präparation oder sonstige Umstände inaktiviert worden, obwohl alle zur Funktion notwendigen Proteine vorhanden sind. Hier binden natürlich auch Antikörper, allerdings ohne meßbaren Effekt. Ein Auseinanderhalten dieser beiden störenden Einflüsse, Heterogenität hier, Inaktivierung da, ist nicht möglich. Durch Verwenden einer einheitlichen Ribosomenpräparation pro Versuchsserie wurde jedoch der Prozentsatz der inaktiven Ribosomen konstant gehalten.

In den Ergebnissen zeigt sich, daß S1 sowohl bei der Initiation als auch beim EF-T-abhängigen Binden von aa-tRNS nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Die Wirkung auf die Elongation ist etwas ausgeprägter, was vielleicht auf den komplizierten Mechanismus der Reaktion zurückgeführt werden kann. Da S1 sehr groß ist, dürfte es auch den größten Kontakt zu seinen Nachbarn haben, bei etwa gleichem Anteil an der Oberfläche des Ribosoms. Für eine direkte Beteiligung an einer der drei untersuchten Funktionen erscheinen trotz der hohen relativen Antikörperkonzentrationen die Inhibitionen zu schwach.

Die Bindung von Spc und Sm jedoch ist durch ein Anti-S1-

Fragment stark gestört. Hier kommt eine direkte Beteiligung an den Funktionen in Frage. Da sowohl bei den 30S- als auch bei den 70S-Ribosomen der starke Effekt auftritt, dürfte der Antikörper nicht an der interface binden.

S2, S3, S14: Für diese drei Proteine wurde eine kooperative Beteiligung an der "A-site" u. "P-site" nachgewiesen (22). Auch in unseren Additionsversuchen konnte eine deutliche Kooperation der drei Proteine bei der enzymatischen Bindung von Phe-tRNS in der Phe-tRNS-Bindungsstelle der 30S-Untereinheit festgestellt werden. Es liegt deshalb nahe, diesen drei Proteinen eine Beteiligung an der "A-site" zuzuordnen.

S2 und S14 sind "fractional"-Proteine, S3 ist ein "marginal"-Protein. Eine Stimulation der Poly-U-Bindung wurde nicht gefunden.

S2: Eine Beteiligung des sauren S2, vielleicht indirekt, an der Initiation kann aus den Ergebnissen geschlossen werden. Beide verwendeten Seren haben unter den gewählten Bedingungen bei mittelstarker Inhibition noch kein Plateau erreicht.

Die Phe-tRNS-Bindung wird nicht beeinflusst, jedoch zeigt sich eine Wirkung auf den Gesamtablauf der Elongation. Die Antibiotika-Wirkungen werden kaum gestört.

S3: Hier ist eine eindeutige Beteiligung sowohl bei der Initiation als auch bei der aa-tRNS-Bindung gegeben. Der relativ schwächere Befund bei der Poly-Phe-Synthese an 70S-Ribosomen und das schwache Ergebnis bei der Phe-tRNS-Bindung an undissoziierte Ribosomen läßt eine Lokalisation der entsprechenden Determinanten im Bereich der Grenzfläche zwischen beiden Untereinheiten möglich erscheinen. S3 scheint also ein Protein der "A-site" und der Initiation zu sein.

Die Beteiligung von S3 bei der Bindung von Spc und Sm ist nicht erwiesen.

S14: Auch S14 hat nach den Inhibitionsergebnissen nichts mit der Bindung der beiden Antibiotika zu tun. Der bei der Vorinkubation gefundene Sachverhalt, daß Sm durch Fab verdrängt wird, ist merkwürdig und ohne Zusatzexperimente nicht zu erklären. Die background-Inhibition bei den Antibiotika-Experimenten ist unverhältnismäßig hoch. Das läßt auf einen unspezifischen Proteineffekt oder eine starke konformationsverän-

dernde Wirkung der Fab's schließen, wobei das relativ zum Fab schwach gebundene Antibiotikum leicht vom Fab teilweise wieder verdrängt werden kann. Danach ist es dem Antibiotikum nicht mehr möglich, zu binden. Bei dem an S14 vorgebundenen Fab scheint dieser "konformative Schock" fortzufallen. Es sieht so aus, als ob der Komplex S14-Fab die Bindung von Sm begünstigt, während bei gebundenem Sm die Ausbildung dieser Formation zur Ablösung des Antibiotikums führen kann.

Die Initiation und aa-tRNS-Bindung werden mittelstark durch Anti-S14-Fab's angegriffen, bei letzterer könnten die Ergebnisse auch eine Beteiligung an der interface anzeigen. Die Gesamtelongation wird stark inhibiert, was auf die Beteiligung an noch anderen Funktionen als den getesteten schließen läßt.

S4: S4 zeigt bei allen getesteten Funktionen nur eine schwache oder gar keine Reaktion.

Obwohl S4 das Genprodukt für die "Reversion" von Str^d zu Strⁱ ist (69,70,87,129,130), zeigt S4 bei versuchter Störung des Bindungsverhaltens von Sm nur eine schwache Reaktion.

S4 ist ein "unit"-Protein und bindet an 16S-RNS (124,131, 132,133). S4 könnte also als reines Skelettprotein gelten - zumal etwa 1/3 des 16S-RNS-Moleküls an der Bindung von S4 beteiligt scheint (134) -, das zwar durch Mutation in seiner Konformation gestört werden kann und damit das Verhalten gegenüber Sm ändert, das aber durch Antikörper nicht zu Änderungen seiner Konformation veranlaßt werden kann.

S5: S5 ist ein "unit"-Protein, das wie S4 in Mutanten von Str^d zu Strⁱ führt, der Unterschied in der Aminosäuresequenz ist jedoch im Gegenteil zu S4 hier sehr klein. Es gibt bei S5 auch sogenannte "assembly defective mutants". Ferner ist S5 eines der beiden Proteine, welches in den E. coli-Stämmen B, C, K und MRE 600 differiert. Glutaminsäure in K ist ersetzt durch Alanin in B (135). Ein weiterer Befund ist, daß S5 zur Resistenz gegen Spectinomycin beiträgt (64). Das wurde gezeigt durch Rekonstitution von "hybriden" 30S-Untereinheiten, bestehend aus Proteinen, die aus resistenten und sensitiven E. coli-Zellen gegen Spc isoliert wurden.

Trotz dieses Katalogs von Befunden zeigen die getesteten

Antikörper nur im Poly-Phe-System eine mittlere Wirkung. Die Initiation wird schwach beeinflusst. Auf Phe-tRNS-Bindung zeigt sich kein Effekt.

Der Verdacht, das Protein S5 könne der Spc-Bindungsort sein, konnte trotz Einsatzes mehrerer Antisera (Abb.26) nicht bestätigt werden. Sollte S5 dennoch Bindungsort von Spc sein, so ist die Wahrscheinlichkeit gering, daß dieser an der Oberfläche des Ribosoms liegt.

Eine veränderte Bindung von Sm konnte jedoch festgestellt werden, wenn Fab's an das S5 assoziierten. Eine Beteiligung dieses Proteins an der Bindung von Sm könnte damit möglich sein.

S6: Dies ist das sauerste Protein der 30S-Untereinheit (IEP: pH 4,9). Es gehört zur Gruppe der "fractional"-Proteine. Die bei der Rekonstitution erwähnte Methode der minus-ein-Protein-Partikel (siehe Seite 86) zeigte bei Weglassen von S6, daß das Bindungsverhalten von f-Met-tRNS gestört war (13). Es konnte in bezug auf die Heterogenität gezeigt werden, daß der Gehalt von S6 von den Wachstumsbedingungen der Zellen abhängt (136,137).

In unseren Versuchen verursachte Anti-S6-Fab eine schwache Inhibition der Initiation, was mit den Befunden von Nomura korreliert. Die Poly-Phe-Synthese wird schwach gestört.

Die Spectinomycin-Bindung wird merkwürdigerweise bei undissoziierten 70S- stärker als bei 30S-Ribosomen gestört. Hier könnte S6 mit der 50S-Untereinheit in Kontakt stehen. Eine Beteiligung an der Grenzfläche zwischen beiden Untereinheiten ist deshalb wahrscheinlich.

Streptomycin wird bei seiner Bindung an die kleine Untereinheit mittelstark gestört. S6 ist nach diesen Befunden offensichtlich, aber vielleicht nur indirekt, an der Sm-Bindung beteiligt.

S7: Wie S5 differiert dieses Protein in den E. coli-Stämmen K12 und B. Es wurde daher auch "K-Protein" genannt (138,139). S7 bindet an die 16S-RNS (140), es ist übereinstimmend damit ein "unit"-Protein.

An allen untersuchten Funktionen ist es nur schwach beteiligt, bei der Bindung von Phe-tRNS lassen sich mit Antikör-

pern keine Wirkungen messen.

S8: S8 ist ebenfalls ein 16S-Bindungsprotein (140 u.a.).

Als "unit"-Protein ist es natürlich in allen Ribosomen vorhanden.

Die Wirkung von Fab's auf Phe-tRNA- und Spc-Bindung an 30S-Untereinheiten ist stärker als auf 70S-Ribosomen. Sie tritt bei der Phe-tRNA-Bindung gar nicht auf. Hier ist S8 sicherlich ein Protein der "interface". Die Wirkung auf das zellfreie Poly-Phe-System ist danach nur mittelstark. Eine Aussage über eine Beteiligung dieses Proteins an der Elongation ist daher nicht zu machen.

S9: Das "unit"-Protein S9 zeigt einige merkwürdige Effekte. Zunächst hatten Zagorska et al. (141) Hinweise auf eine Beteiligung beider aktiven Zentren, der 30S "A-site" und der 50S "P-site", an der f-Met-tRNA-Bindung. Auf eine Verbindung dieser Befunde mit S9 wird im Folgenden eingegangen.

Traub et al. (114) zeigten, daß partielle Rekonstitution mit 23S-core-Partikeln unter Ausschluß von S9 zu funktionsfähigen Untereinheiten führte, jedoch waren in Abwesenheit von 50S-Untereinheiten die Phe-tRNA- und die f-Met-tRNA-Bindung signifikant erniedrigt. Nomura et al. (13) zeigten, daß bei Totalrekonstitution S9 absolut notwendig war. S9 scheint also für das Frühstadium der Rekonstitution benötigt zu werden, später jedoch kann es fehlen.

Auch in unseren Experimenten drückt sich der Befund aus, daß die 50S-Untereinheit für die Phe-tRNA-Bindung wichtig ist. Die Fab-induzierte Inhibition des Systems ist bei 30S-Partikeln stark, bei 70S-Ribosomen aber nur mittelstark, was auf eine Stabilisierung des Komplexes durch die große Untereinheit hinweist. Eine Erklärung könnte in der Beteiligung von S9 an der "interface" gesucht werden. Die Poly-Phe-Synthese wird sehr stark durch Anti-S9-Fab's gestört. Hier scheint die aa-tRNA-Bindungsstelle betroffen zu sein.

Die Initiation wird nur schwach gestört. Keine Wirkung lösen Fab's gegen S9 bei den Antibiotika-Bindungstesten aus.

S10: S10 ist ein "fractional"-Protein. Antikörper gegen dieses Protein stören die Initiation sehr stark! Eine direkte Beteiligung dieses Proteins bei der Initiation scheint vorzu-

liegen. Die Poly-Phe-Synthese wird stark inhibiert, die aa-tRNS-Bindung in der "A-site" ist bei 30S-Untereinheiten mittelstark betroffen, bei 70S-Ribosomen zeigt sich nur eine schwache Wirkung. S10 erscheint also an den Funktionen der Initiation als auch der Elongation beteiligt.

Sowohl die Bindung von Spc als auch von Sm sind durch Anti-S10-Fab's mittel bis stark affektierbar. Bei den Experimenten mit Spectinomycin hat sich gezeigt, daß bei den Proteinen S10, S18 und S19 das jeweilig nachgebundene Fab das Antibiotikum nicht mehr zu verdrängen in der Lage war. Abschließend wird darauf noch eingegangen werden.

S11: Das "fractional"-Protein S11 wird auch Genauigkeitsprotein (fidelity) genannt, da minus S11-Partikel bei der Totalrekonstitution in Gegenwart von Sm drastisch das Übersetzungs misreading (falsch lesen) des Poly-U-Poly-Phe-Systems erhöhen (13). Modifiziertes S11 reduziert die Interaktion zwischen tRNS und mRNS (115).

In unseren Ergebnissen zeigt sich eine sehr starke Störung der Poly-Phe-Synthese. Die Beteiligung des Proteins S11 an der Elongation ist offenkundig. Da nur Phenylalanin in dem Experiment vorhanden war, kann ein eventuelles Fehllesen nur indirekt durch "Inhibition" (d.h. wenig produziertes Protein) erschlossen werden. Hier könnte der Antikörper eine ähnliche Wirkung wie das Sm in Nomuras Experimenten haben.

Auch an der "A-site" scheint S11 beteiligt zu sein, da die Phe-tRNS-Bindung mittelstark durch Fab's inhibiert wird.

Die Sm-Bindung ist wieder stark bei 30S-Untereinheiten und mittelstark bei 70S-Ribosomen gestört. Hier ist S11 ebenso wie S10 in die Bindung von Sm involviert. Die schwächere Inhibition der 70S-Ribosomen, i.G. zu den 30S-Untereinheiten bei S11 und S19, lassen sich wie bei S8 im Spectinomycin-Experiment erklären als Differenzen, hervorgerufen durch "interface"-Proteine.

S12: Das "fractional"-Protein S12 ist gegensätzlich zu S11 in seiner Funktion bei der Poly-Phe-Synthese in Gegenwart von Sm (13), es heißt deshalb auch Zweideutigkeitsprotein (ambiguity).

In unseren Versuchen wird die aa-tRNS-Bindung überhaupt

nicht, die Poly-Phe-Synthese schwach und dagegen die Initiation mittelstark durch Fab's gehemmt. Es bleibt zu untersuchen, inwieweit eine durch natürlichen messenger induzierte Proteinsynthese durch Sm und/oder Fab's gestört wird. Außerdem stimmt der Befund überein mit der Wirkungsweise von Sm in vivo auf die Initiation (168). Hier könnten sich die kontroversen Funktionen von S11 und S12 widerspiegeln. Es sind jedoch detailliertere Versuche notwendig, um hier klare Verhältnisse zu schaffen.

Ähnlich wie bei S5 wurde mit "hybriden" 30S-Partikeln gezeigt, daß das Protein S12 Resistenz gegen und Abhängigkeit von Sm transferriert (66,142). Auch in diesem Zusammenhang zeigen die Sm-Versuche keinen Anhaltspunkt dafür, daß S12 an der Bindung von Sm direkt beteiligt ist.

Die Spectinomycin-Bindung wird ebenfalls kaum beeinflusst. S13: S13 steht in der Gruppe der "marginal"-Proteine. Seine Bindung an die 16S-RNS ist umstritten.

Bei uns inhibiert es die Poly-Phe-Synthese stark und die f-Met-tRNS-Bindung mittelstark. Die anderen Funktionen zeigen keine signifikante Störung.

S14: S14 wurde oben, in Zusammenhang mit S2 und S3 besprochen.

S15: S15 ist ein "unit"-Protein, das an die 16S-RNS bindet. In unseren Versuchen ist es durch keine signifikante Störung einer der untersuchten Funktionen aufgefallen.

S16: Die Bindung an 16S-RNS ist auch bei diesem Protein umstritten.

Dieses "unit"-Protein wird durch Antikörper nur zu geringen Funktionsstörungen veranlaßt.

S17: Wegen der schlechten Isolierbarkeit ist dieses "unit"-Protein in unseren Versuchen nicht berücksichtigt worden. Die Kriterien für antigene Reinheit konnten für dieses Protein nicht erfüllt werden.

S18: Von diesem "fractional"-Protein wurde mit bifunktionalen Reagenzien gezeigt, daß es mit S21 verkoppelbar ist (12, 143,148). Die Koppelungsdistanz ist 5,2 bis 12,0 Å groß (21, 148). Zusätzlich bildet dieses Protein i.G. zu allen anderen untersuchten eine Ausnahme: der Genort für dieses Protein auf dem Genom von E. coli soll außerhalb der sogenannten "Str-

Region" liegen (Bollen, pers. Mitteilung).

In unseren Versuchen sind Anti-S18-Fab's starke inhibitorische Effektoren in bezug auf die Phe-tRNS-Bindung, die Poly-Phe-Synthese, sowie die Bindung der beiden Antibiotika. Die Initiation wird wenig betroffen.

S18 scheint also ein Protein der "A-site" zu sein und gleichzeitig im Bindungsbereich von Sm und Spc zu liegen. Wie bei S6 könnte der Befund der stärkeren Inhibition bei 7oS-Ribosomen als bei 3oS-Untereinheiten einen Hinweis auf eine Interaktion mit der 5oS-Untereinheit geben.

S19: Das "fractional"-Protein S19 zeigt auch eine Beteiligung an allen getesteten Funktionen.

Drastisch inhibiert wird die Initiation durch ein Anti-S19-Fab, während ein anderes diese Funktion nur schwach stört. Dieser Effekt muß dahingehend gedeutet werden, daß hier verschiedene Determinanten erkannt werden, die eine unterschiedliche Position zum aktiven Zentrum haben.

Sehr stark inhibiert wird ebenfalls die Sm-Bindung, während die Spc-Bindung wenig beeinflusst wird. Die Poly-Phe-Synthese sowie die Phe-tRNS-Bindung sind stark bzw. mittelstark von der Wirkung der Fab's betroffen.

Auf eine Beteiligung dieses Proteins an allen Funktionen bis auf die Spectinomycin-Bindung muß hier geschlossen werden. S19 scheint damit funktionell eine zentrale Stellung einzunehmen.

S20: S20 bindet an die 16S-RNS. In allen unseren Versuchen zeigt es eine etwa gleichstarke Beteiligung an allen untersuchten Funktionen. Dies deutet eine funktionell zentrale Stellung an.

Eine Interaktion mit der 5oS-Untereinheit wie bei den Proteinen S6, S18 und S21 scheint die relativ stärkere Inhibition bei den 7oS-Ribosomen als bei den 3oS-Untereinheiten widerzuspiegeln.

S21: Dieses "fractional"-Protein ist das kleinste und basischste der Proteine (5,115,144,145). Es liegt bei Zellen aus reichem Medium als "fractional"- und bei solchen aus Minimalmedium als "unit"-Protein vor. Van Duin et al. (146) fanden, daß von Polysomen isolierte 3oS-Untereinheiten mehr

S21 enthalten als native 30S. Es gilt als "Initiations"-Protein, da Addition von S21 die Bindung von f-Met-tRNS inhibiert. Es scheint damit mit IF2 zu konkurrieren (146).

Chemisch modifizierte S21 reduziert die Interaktion zwischen tRNS und mRNS (115) wie bei S11. Über die Nachbarschaft von S21 mit S18 wurde bei S18 berichtet.

Als sehr starker Inhibitor der Initiationsreaktion treten hier die Fab's gegen S21 auf. Die Befunde von van Duin können voll bestätigt werden. S21 ist für die Initiation von hervorragender Bedeutung. Die Elongation wird ebenfalls stark gestört, wenn dieses Protein angegriffen wird.

Merkwürdig ist der Befund bei der Spc-Bindung, wo Antikörper bei 30S-Untereinheiten kaum eine Wirkung hervorrufen, im System mit 70S-Ribosomen jedoch stark inhibieren. Hier muß gefragt werden, ob die 30S-Untereinheit mit der großen Untereinheit über S21 Kontakt hat.

Auch die Sm-Bindung wird mittelstark gehemmt, so daß S21 auch hier eine aktive Funktion zu haben scheint.

In der Tabelle 3 wurde versucht, zu ermitteln, ob erkennbar ist, welche Proteine nach Fab-Zugabe einen Teil der Ribosomen veranlassen, die Proteinbiosynthese ganz zu stoppen, während die anderen voll aktiv bleiben und welche inaktive und langsamere Ribosomen induzieren. Die Proteine S5, S8, S18 und S20 sind zweifellos der Grund für den Totalausfall der Ribosomen bei der Poly-Phe-Synthese, wenn sie von spezifischen Antikörpern gebunden werden, denn langsam synthetisierende Ribosomen würden eine Differenz zwischen der Plateauinhibition und der Inhibition im linear ansteigenden Ast der Kinetik verursachen. Diese Proteine sind offensichtlich in entscheidender Position, was den Elongationsprozess angeht. Bei S5 und S8 wird jedoch nur ein geringer Prozentsatz von Ribosomen betroffen, ein wesentlich größerer ist voll aktiv. Die Art der Beteiligung an der Elongation bleibt unklar.

Die Zuordnung der Proteine S2, S3, S9 und S21 zu dieser Gruppe ist nicht eindeutig, was die Auswertung der Experimente betrifft. Sie könnten auch der folgenden Gruppe zuzuordnen sein.

Zur Gruppe B gehören die Proteine S4, S7, S11, S13, S14 und S15. Sie weisen eine positive Differenz zwischen Plateauinhibition und Inhibition im linear ansteigenden Bereich der Kinetik auf. Das kann aber nur bedeuten, daß neben total inaktiven und aktiven Ribosomen noch langsam aktive vorhanden sind (Delta%). Wie schon einmal erwähnt, umfaßt die kleinste Proteindeterminante eines Antigens 4 Aminosäuren (92). Der diese Determinante abdeckende Antikörper wird wahrscheinlich größere Bereiche um diese Determinante herum unzugänglich für andere Antikörper machen. Je nachdem, welcher Antikörper in diesem Bereich gebunden hat, wird das Ribosom in Abhängigkeit von der Auswirkung auf ein aktives Zentrum teilweise oder ganz inaktiviert. Ferner ist es denkbar, daß Determinanten geschachtelt sind, so daß der Antikörper mit der höchsten Bindungskonstante sich durchsetzt. Die dadurch resultierenden kompetitiven Effekte könnten zu den oben genannten Ergebnissen beitragen.

Bei der C-Gruppe mit den Proteinen S10 und S12 könnten zeitlich bedingte Degradationsprozesse (z.B. Temperatur) infolge der Fab-Bindung eintreten, so daß die relative Inhibition bis zum Plateauwert zunimmt.

Zusammenfassung:

Zusammenfassend und ergänzend kann gesagt werden:

f-Met-tRNS-Bindung: An der enzymatischen IF2-abhängigen f-Met-tRNS-Bindung scheinen die Proteine S3, S10, S19 und S21 direkt beteiligt zu sein. Eine indirekte Beteiligung gilt für die Proteine S2, S12, S13, S14 und S20. Traut berichtete (pers.Mitteilung), daß die Proteine S13, S9, S19 sowie S14 und S10 mit IF2 reagieren. Das ist bis auf S9 mit unseren Ergebnissen in Einklang zu bringen.

Phe-tRNS-Bindung: Für die enzymatische Phe-tRNS-Bindung scheint S3 unmittelbar nach der Stärke der Inhibition an der "A-site" beteiligt. Man kann nicht ausschließen, daß die Proteine S9, S18 und S21 auch direkt involviert sind. Eine gewisse Fernwirkung könnten die Proteine S10, S11, S14, S19 sowie S20 anzeigen. Über die Additionsexperimente ergibt sich eine Beteiligung der Proteine S2, S3 und S14 an der "A-site" des Ribosoms. Hier ist es wichtig, schwache Antikörper nicht für

die Experimente zu verwenden, da dadurch die Aussagen verschleiert werden (siehe Seite 65, Abb.22 und Tab.5).

Poly-U-Poly-Phe: Die Poly-U kodierte Poly-Phe-Synthese dürfte hauptsächlich nach unseren Ergebnissen von den Proteinen S9 und S11 abhängen. Jedoch sind stark an der Funktion beteiligt, eventuell nur statisch, d.h. die Funktion "stützende" Komponenten, die Proteine S3, S10, S13, S14, S18, S19, S20 und S21.

Zur Bindung der beiden Antibiotika Spectinomycin und Streptomycin sind folgende Gruppen von Proteinen wesentlich: Spc: S1, S8, S10, S18 und S20; S21 hat die erwähnte Sonderstellung, da es nur in Verbindung mit den 50S-Untereinheiten eine Wirkung zeigt. Bei S10, S18 und S19 scheint das spezifische Fab das Spc nicht mehr verdrängen zu können, während vorgebundene Fab's die Bindung teilweise verhindern können. Eine Kooperativität bei der Spectinomycin-Bindung ist für die Proteine S1, S19, S20 und S21 nicht nachzuweisen.

Sm: Hier kommt S19 als wichtigstes Protein heraus, danach sind es die Proteine S1, S5, S6, S20 und S21, die den Bindungsmechanismus stören. S14 scheint in Verbindung mit seinem Fab die Bindung von Sm zu erleichtern.

"Interface": Elf Proteine zeigen Verhaltensdifferenzen, wenn sie in Systemen mit 30S- und 70S-Ribosomen untersucht werden. Das läßt auf eine Beteiligung der 50S-Untereinheit schließen bzw. die antigene Determinante liegt im Bereich der "interface". Es sind die Proteine: S3, S6, (S8), S9, S10, S11, S14, S18, S19, S20 und S21.

Verwendete Puffer

Ribosomenpuffer:

10 mM Tris-HCl, pH 7,6) (Merck)
 10 mM Mg-Acetat)

RF(S100)-Puffer:

wie Ribosomenpuffer + β -Mercaptoäthanol (Serva) 6 mM

Aufarbeitungspuffer:

10 mM Tris-HCl, pH 7,8
 10 mM Mg-Acetat
 60 mM KCl (Merck)
 6 mM β -Mercaptoäthanol

Dissoziationspuffer:

10 mM K-Phosphat, pH 7,4) (Merck)
 1 mM $MgCl_2$)
 1 mM β -Mercaptoäthanol

TMAI-Puffer:

10 mM Tris-HCl, pH 7,8
 10 mM $MgCl_2$
 30 mM NH_4Cl (Merck)
 6 mM β -Mercaptoäthanol

TMN8-Puffer:

500 mM Tris-HCl, pH 7,8
 80 mM Mg-Acetat
 800 mM NH_4Cl
 70 mM β -Mercaptoäthanol

TMN8 wurde zu 1/2TMN8 und 1/10TMN8 mit H_2O (bidest) verdünnt.

TSMI-Puffer:

100 mM Tris-HCl
 30 mM Bernsteinsäure (Merck)
 100 mM $Mg-Cl_2$
 TSMI mit 0,6 M $(NH_4)_2SO_4$: 79,3g $(NH_4)_2SO_4$ + 100 ml
 TSMI + H_2O ad 1l.

Puffer A:

10 mM Tris-HCl, pH 7,4
 10 mM Mg-Acetat
 1 mM DTT (Dithiothreitol) (Calbiochem)

Puffer B:

- 50 mM Tris-HCl, pH 7,4
- 500 mM NH_4Cl
- 40 mM Mg-Acetat
- 1 mM EDTA (Äthylendiamintetraessigsäure) (Merck)
- 1 mM DTT

Puffer C:

- 20 mM Tris-HCl, pH 7,4
- 1 mM EDTA
- 1 mM DTT
- 10 % Glycerin (Merck)

Puffer D:

wie Puffer C, ohne Glycerin.

Ouchterlony-Puffer für Ribosomen:

- 20 mM Tris-HCl, pH 7,5
- 20 mM Mg-Acetat
- 25 mM NH_4 -Acetat (Merck)
- 0,002 % Cialit (Asid-Institut GmbH)

Ouchterlony-Puffer für Antikörper

- 30 mM K-Phosphat, pH 8,0
- 0,9 % NaCl (Merck)
- 0,002 % Cialit

Wässerungspuffer für Ouchterlony:

- 100 mM Tris-HCl, pH 7,4
- 0,9 % NaCl

Literatur

- 1 Hall, C.E., H.S. Slayter, J. Mol. Biol. 1, 329 (1959).
- 2 Huxley, H.E., G. Zubay, J. Mol. Biol. 2, 10 (1960).
- 3 Kaltschmidt, E., H.G. Wittmann, Anal. Biochem. 36, 401 (1970).
- 4 Wittmann, H.G., G. Stöffler, I. Hindenach, C.G. Kurland, L. Randall-Hazelbauer, E.A. Birge, M. Nomura, E. Kaltschmidt, S. Mizushima, R.R. Traut, T.A. Bickle, Mol. Gen. Genet. 111, 327 (1971).
- 5 Dzionara, M., E. Kaltschmidt, H.G. Wittmann, Proc. Nat. Acad. Sci. US. 67, 1909 (1970).
- 6 Terhorst, C., W. Möller, R.A. Laursen, B. Wittmann-Liebold, FEBS Letters 28, 325 (1972).
- 7 Kaltschmidt, E., M. Dzionara, D. Donner, H.G. Wittmann, Mol. Gen. Genet. 100, 364 (1967).
- 8 Traut, R.A., R.R. Moore, H. Delius, H. Noller, A. Tissières, Proc. Nat. Acad. Sci. US. 57, 1294 (1967).
- 9 Fogel, S., P.S. Sypherd, Proc. Nat. Acad. Sci. US. 59, 1329 (1968).
- 10 Moore, P.B., R.R. Traut, M. Noller, P. Pearson, H. Delius, J. Mol. Biol. 31, 441 (1968).
- 11 Hardy, S.J.S., C.G. Kurland, P. Voynow, G. Mora, Biochemistry 8, 2897 (1969).
- 12 Craven, C.R., P. Voynow, S.J.S. Hardy, C.G. Kurland, Biochemistry 8, 2906 (1969).
- 13 Nomura, M., S. Mizushima, M. Ozaki, P. Traub, C.V. Lowry, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 49 (1969).
- 14 Möller, W., A. Chrambach, J. Mol. Biol. 23, 377 (1967).
- 15 Kurland, C.G., J. Mol. Biol. 18, 90 (1966).
- 16 Kurland, C.G., P. Voynow, S.J.S. Hardy, L. Randall, L. Lutter, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 17 (1969).
- 17 Voynow, P., C.G. Kurland, Biochemistry 10, 517 (1971).
- 18 Traut, R.A., H. Delius, C. Ahmad-Zadeh, T.A. Bickle, P. Pearson, A. Tissières, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 25 (1969).
- 19 Weber, H.J., Mol. Gen. Genet. 119, 233 (1972).
- 20 Van Duin, J., C. G. Kurland, Mol. Gen. Genet. 109, 169 (1970).

- 21 Chang, F.N., J.G. Flaks, J. Mol. Biol. 68, 177 (1972).
- 22 Randall-Hazelbauer, L., C. G. Kurland, Mol. Gen. Genet. 115, 234 (1972).
- 23 Lengyel, P., D. Söll, Bacteriol. Rev. 33, 264 (1969).
- 24 Lucas-Lenard, J., F. Lipmann, Ann. Rev. Biochem. 40, 409 (1971).
- 25 Nierhaus, K., Umschau in Wissenschaft und Technik 72, 11, 346 (1972).
- 26 Nomura, M., Bacteriol. Rev. 34, 228 (1970).
- 27 Wittmann, H.G., G. Stöffler, Review in "Proteinbiosynthesis", ed. L. Bosch, North Holland Publ. Comp., Amsterdam (1972).
- 28 Clark, B.F.C., K.A. Marcker, J. Mol. Biol. 17, 394 (1966).
- 29 Ghosh, H.P., D. Söll, H.G. Khorana, J. Mol. Biol. 25, 275 (1967).
- 30 Takanami, M., T. Okamoto, J. Mol. Biol. 7, 323 (1963).
- 31 Gilbert, W., J. Mol. Biol. 6, 389 (1963).
- 32 Salas, M., M.B. Hille, J.A. Last, A.J. Wahba, S. Ochoa, Proc. Nat. Acad. Sci. US. 57, 387 (1967).
- 33 Lucas-Lenard, J., F. Lipmann, Proc. Nat. Acad. Sci. US. 57, 1050 (1967).
- 34 Allende, J.E., H. Weissbach, Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 82 (1967).
- 35 Anderson, J.S., M.S. Bretscher, B.F.C. Clark, K.A. Marcker, Nature 215, 490 (1967).
- 36 Leder, P., M.M. Nau, Proc. Nat. Acad. Sci. US. 58, 774 (1967).
- 37 Hille, M.B., M.J. Miller, K. Iwasaki, A.J. Wahba, Proc. Nat. Acad. Sci. US. 58, 1652 (1967).
- 38 Ohta, T., S. Sarkar, R.E. Thach, Proc. Nat. Acad. Sci. US. 58, 1638 (1967).
- 39 Kolakofsky, D., T. Ohta, R.E. Thach, Nature 220, 244 (1968).
- 40 Kondo, M., G. Eggerston, J. Eisenstadt, P. Lengyel, Nature 220, 368 (1968).
- 41 Hershey, J.W.B., R.E. Monro, J. Mol. Biol. 18, 68 (1966).
- 42 Salas, M., M.J. Miller, A.J. Wahba, S. Ochoa, Proc. Nat. Acad. Sci. US. 57, 1865 (1967).
- 43 Revel, M., M. Herzberg, H. Greenspahn, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 261 (1969).

- 44 Wahba, A.J., K. Iwasaki, M.J. Miller, S. Sabol, M.A.G. Sillero, C. Vasquez, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 291 (1969).
- 45 Brown, J.C., P. Doty, Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 284 (1968).
- 46 Revel, M., J.C. Lelong, G. Brawman, F. Gros, Nature 219, 1016 (1968).
- 47 Nishizuka, Y., F. Lipmann, Proc. Nat. Acad. Sci. US. 55, 212 (1966).
- 48 Allende, J.E., R. Monro, F. Lipmann, Proc. Nat. Acad. Sci. US. 51, 1211 (1964).
- 49 Lucas-Lenard, J., F. Lipmann, Proc. Nat. Acad. Sci. US. 55, 1562 (1966).
- 50 Monro, R.E., B.E.H. Maden, R.R. Traut, "Genetic Elements Properties and Funktionen", ed. D. Shugar, 179, New York Academic 361pp (1967).
- 51 Miller, D.L., J. Hachmann, H. Weissbach, Arch. Biochem. Biophys. 144, 115 (1971).
- 52 Skoultchi, A., Y. Ono, J. Waterson,, P. Lengyel, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 437 (1969).
- 53 Ravel, J.M., R.L. Shorey, C.W. Garner, R.C. Dawkins, W. Shive, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 321 (1969).
- 54 Miller, D.L., H. Weissbach, Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 1016 (1970).
- 55 Waterson, J., G. Beut, P. Lengyel, Nature 227, 34 (1970).
- 56 Nishizuka, Y., F. Lipmann, Arch. Biochem. Biophys. 116, 344 (1966).
- 57 Tanaka, N., T. Kinoshita, H. Masukawa, Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 278 (1968).
- 58 Pestka, S., J. Biol. Chem. 244, 1533 (1969).
- 59 Erbe, R.W., P. Leder, Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 298 (1968).
- 60 Erbe, R.W., M.M. Nau, P. Leder, J. Mol. Biol. 39, 441 (1969).
- 61 Bodley, J.W., F.J. Zieve, L. Lin, S.T. Zieve, Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 437 (1969).
- 62 Davies, J., P. Anderson, B.D. Davis, Science 149, 1096(1965).

- 63 Funatsu, G., K. Nierhaus, B. Wittmann-Liebold, J. Mol. Biol. 64, 201 (1972).
- 64 Bollen, A., J. Davies, M. Ozaki, S. Mizushima, Science 165, 58 (1969).
- 65 Bollen, A., T. Helser, T. Yamada, J. Davies, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 95 (1969).
- 66 Ozaki, M., S. Mizushima, M. Nomura, Nature 222, 333 (1969).
- 67 Kaji, H., J. Tanaka, J. Mol. Biol. 32, 221 (1968).
- 68 Momose, H., L. Gorini, Genetics 67, 19 (1971).
- 69 Deusser, E., G. Stöffler, H.G. Wittmann, D. Apirion, Mol. Gen. Genet. 109, 298 (1970).
- 70 Birge, E.A., C.G. Kurland, Mol. Gen. Genet. 109, 356 (1970).
- 71 Stöffler, G., E. Deusser, H.G. Wittmann, D. Apirion, Mol. Gen. Genet. 111, 334 (1971).
- 72 Davies, J., L. Gorini, B.D. Davis, Mol. Pharmacol. 1, 93 (1965).
- 73 Porter, R.R., Biochem. J. 73, 119 (1959).
- 74 Putnam, F.W., M. Tan, L.T. Lynn, C.W. Easley, S. Migita, J. Biol. Chem. 237, 717 (1962).
- 75 Sela, M., Advanc. Immunol. 5, 29 (1966).
- 76 Kabat, E.A., J. Immunol. 97, 1 (1966).
- 77 Karush, F., Advanc. Immunol. 2 (1962).
- 78 Singer, S.J., in "The Proteins", 3, 269 (1965).
- 79 Eisen, H.N., J.H. Pearce, Ann. Rev. Microbiol. 16, 101 (1962).
- 80 Salas, M., M.A. Smith, W.M. Stanley, A.J. Wahba, S. Ochoa, J. Mol. Biol. 240, 3988 (1965).
- 81 Eikenberry, E.F., T.A. Bickle, R.R. Traut, C.A. Price, Eur. J. Biochem. 12, 113 (1970).
- 82 Hindenach, I., G. Stöffler, H.G. Wittmann, Eur. J. Biochem. 23, 7 (1971).
- 83 Hershey, J.W., E. Remold-O'Donnell, D. Kolakofsky, K.F. Dewey, R.E. Thach, Methods in Enzymology 20, 235 (1971).

- 84 Lelong, J.C., M.-A. Cousin, F. Gros, R. Miskin, Z. Vogel, Y. Groner, M. Revel, Eur. J. Biochem. 27, 174 (1972).
- 85 Ravel, J.M., R.A. Shorey, Methods in Enzymology 20, 306 (1971).
- 86 Ouchterlony, O.A., Pathol. Microbiol. Scand. 26, 507 (1949).
- 87 Stöffler, G., H.G. Wittmann, Proc. Nat. Acad. Sci. US. 68, 2283 (1971).
- 88 Kabat, E.A., Heidelberger Taschenbücher, Springer Verlag, 166 (1971).
- 89 Nakamoto, T., D. Kolakofsky, Proc. Nat. Acad. Sci. US. 55, 606 (1966).
- 90 Nirenberg, M.W., J.H. Matthaei, Proc. Nat. Acad. Sci. US. 47, 1588 (1961).
- 91 Guthrie, C., M. Nomura, Nature 219, 232 (1968).
- 92 Sela, M., B. Schechter, I. Schechter, F. Borek, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 32, 537 (1967).
- 93 Cannon, M., FEBS Letters 8, 217 (1970).
- 94 Karush, F., J. Am. Chem. Soc. 78, 5519 (1956).
- 95 Karush, F., J. Am. Chem. Soc. 79, 3380 (1957).
- 96 Eisen, N.H., G.W. Siskind, Biochem. 3, 996 (1964).
- 97 Kim, S.H., G.J. Quigley, F.L. Suddath, A. McPherson, D. Sneden, J.J. Kim, J. Weinzierl, A. Rich, Science 179, 285 (1973).
- 98 Valentine, R.C., N.M. Green, J. Mol. Biol. 27, 615 (1967).
- 99 Sarma, V.R., E.W. Silvertown, D.R. Davies, W.D. Terry, J. Biol. Chem. 246, 3753 (1971).
- 100 Labaw, L.W., D.R. Davies, J. Biol. Chem. 246, 3760 (1971).
- 101 Nomura, M., C.V. Lowry, Proc. Nat. Acad. Sci. US. 58, 946 (1967).
- 102 Nomura, M., C.V. Lowry, C. Guthrie, Proc. Nat. Acad. Sci. US. 58, 1487 (1967).
- 103 Davies, D.R., V.R. Sarma, L.W. Labaw, E.V. Silvertown, W.D. Terry, "Three-Dimensional Structure of Immunoglobulins," Progress in Immunology, ed. B. Amos, Academic Press, N.Y. and London (1971).
- 104 Edelman, M., Scientific American 2, 34 (1970).
- 105 Wabl, M., Dissertation, Freie Universität Berlin-Dahlem, FB 23(1973).

- 106 Staehelin, T., M. Meselson, J. Mol. Biol. 15, 245 (1966).
- 107 Hosokawa, K., R.K. Fujimura, M. Nomura, Proc. Nat. Acad. Sci. US. 55, 198 (1966).
- 108 Traub, P., M. Nomura, L. Tu, J. Mol. Biol. 19, 215 (1966).
- 109 Gesteland, R.F., T. Staehelin, J. Mol. Biol. 24, 149 (1967).
- 110 Traub, P., M. Nomura, Proc. Nat. Acad. Sci. US. 59, 777 (1968).
- 111 Traub, P., M. Nomura, J. Mol. Biol. 34, 575 (1968).
- 112 Traub, P., M. Nomura, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 63 (1969).
- 113 Traub, P., M. Nomura, J. Mol. Biol. 40, 391 (1969).
- 114 Traub, P., K. Hosokawa, G.R. Craven, M. Nomura, Proc. Nat. Acad. Sci. US. 58, 2430 (1967).
- 115 Craven, G.R., R. Gavin, T. Fanning, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 129 (1969).
- 116 Fanning, T., Ph.D. Thesis (Univ. Wisconsin, Madison), p. 135 (1971).
- 117 Sonoda, S., M. Schlamowitz, Immunochemistry 7, 885 (1970).
- 118 Greenwood, F.C., W.M. Hunter, J.S. Glover, Biochem. J. 89, 114 (1963).
- 119 Quash, G., J.P. Dandeu, E. Barbu, J. Panijel, Ann. Inst. Pasteur 103, 3 (1962).
- 120 Dandeu, J.P., E. Barbu, Ann. Inst. Pasteur, Suppl. No. 3, 110, 59 (1966).
- 121 Estrup, F., M. Santer, J. Mol. Biol. 20, 447 (1966).
- 122 Friedmann, D.I., J.G. Olenick, F.E. Hahn, J. Mol. Biol. 32, 579 (1968).
- 123 Stöffler, G., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 1166 (1969).
- 124 Stöffler, G., L. Daya, K.H. Rak, R.A. Garrett, Mol. Gen. Genet. 62, 411 (1971).
- 125 Stöffler, G., H.G. Wittmann, J. Mol. Biol. 62, 407 (1971).
- 126 Thamana, P., C.G. Kurland, E. Deusser, J. Weber, R. Maschler, G. Stöffler, H.G. Wittmann, Nature 242, 47 (1973).
- 127 Arnon, R., Current Topics in Microbiology and Immunology 54, 47 (1971).

- 128 Melchers, F., W. Messer, Eur. J. Biochem. 35, 380 (1973).
- 129 Kreider, G., B.L. Brownstein, J. Mol. Biol. 61, 135 (1971).
- 130 Hasenbank, R., C. Guthrie, G. Stöffler, H.G. Wittmann, Rosen, D. Apirion, Mol. Gen. Genet. (im Druck) (1973).
- 131 Mizushima, S., M. Nomura, Nature 226, 1214 (1970).
- 132 Schaup, H.W., M. Green, C.G. Kurland, Mol. Gen. Genet. 109, 193 (1970).
- 133 Garrett, R.A., K.H. Rak, L. Daya, G. Stöffler, Mol. Gen. Genet. 114, 112 (1971).
- 134 Nanninga, N., Int. Rev. Cytology (im Druck) (1973).
- 135 Wittmann-Liebold, B., H.G. Wittmann, Biochem. Biophys. Acta 251, 44 (1971).
- 136 Deusser, E., H.G. Wittmann, Nature 238, 269 (1972).
- 137 Deusser, E., Mol. Gen. Genet. 119, 249 (1972).
- 138 Leboy, P.S., E.C. Cox, J.G. Flaks, Proc. Nat. Acad. Sci. US. 52, 1367 (1964).
- 139 Stöffler, G., Mol. Gen. Genet. 100, 374 (1967).
- 140 Zimmermann, R.A., A. Muto, P. Fellner, C. Ehresmann, C. Branlant, Proc. Nat. Acad. Sci. US. 69, 1282 (1972).
- 141 Zagorska, L., J. Dondon, J.C. Lelong, F. Gros, M. Grunberg-Manago, Biochemie 53, 63 (1971).
- 142 Birge, E.A., C.G. Kurland, Science 166, 1282 (1969).
- 143 Kurland, C.G., M. Green, H. Schaup, D. Donner, L. Lutter, E.A. Birge, FEBS Symposium, Varna (1971).
- 144 Kaltschmidt, E., M. Dzionara, H.G. Wittmann, Mol. Gen. Genet. 109, 292 (1970).
- 145 Kaltschmidt, E., Anal. Biochem. 43, 25 (1971).
- 146 VanDuin, J., P.H. Van Knippenberg, M. Dieben, C.G. Kurland, Mol. Gen. Genet. 116, 181 (1972).
- 147 Sela, M., E. Mozes, Proc. Nat. Acad. Sci. US. 55, 445 (1966).
- 148 Lutter, L.C., H. Zeichhardt, C.G. Kurland, G. Stöffler, Mol. Gen. Genet. 119, 357 (1972).
- 149 Paradies, H., A. Franz, Biochemistry (im Druck) (1973).
- 150 Lemieux, G., J.-F. Lefevre, M. Daune, Eur. J. Biochem. (im Druck) (1973).
- 151 Bodley, J.N., F.J. Zieve, L. Lin, J. Biol. Chem. 45, 5662 (1970).

- 152 Benjamini, E., D. Michaeli, J.D. Young, Current Topics in Microbiology and Immunology 58, 85 (1972).
- 153 Bickle, T.A., J.W.B. Hershey, R.R. Traut, Proc. Nat. Acad. Sci. US. 69, 1327 (1972).
- 154 Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 32, (1967).
- 155 Caskey, T., P. Leder, K. Moldave, D. Schlessinger, Science 176, 195 (1972).
- 156 Garrett, R.A., H.G. Wittmann, Adv. Prot. Chem. 27, (im Druck) (1973).
- 157 Kurland, C.G., Ann. Rev. Biochem. 41, 377 (1972).
- 158 Davis, B.D., R. Dulbecco, H.N. Eisen, H.S. Ginsberg, W.B. Wood, jr., in "Principles of Microbiology and Immunology", ed. Harper and Row, N.Y. and London, and J. Weatherhill, Inc., Tokyo (1968).
- 159 Cotter, R.I., W.B. Gratzer, Eur. J. Biochem. 23, 468 (1971).
- 160 Chang, F.N., J.G. Flaks, Proc. Nat. Acad. Sci. US. 67, (1970).
- 161 Craven, G.R., V. Gupta, Proc. Nat. Acad. Sci. US. 67, 1329 (1970).
- 162 Spitnik-Elson, P., A. Breiman, Biochem. Biophys. Acta 254, 457 (1971).
- 163 Crichton, R.R., H.G. Wittmann, Molec. Gen. Genet. 114, 95 (1971).
- 164 Caskey, T., P. Leder, K. Moldave, D. Schlessinger, Science 176, 195 (1972).
- 165 Hart, R.G., Biochem. Biophys. Acta 60, 629 (1962).
- 166 Feigl, F., "Spot Tests, I. Inorganic Applications", ed. Elsevier Publishing Comp., Amsterdam (1954).
- 167 Celada, F., R. Strom, Quaterly Rev. Biophys. 5, 3, 395 (1972).
- 168 Modolell, J., B.D. Davis, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 113 (1969).
- 169 Mossmann, H., K. Bartsch, E. Rude, B. Kickhöfen, D.K. Hammer, Eur. J. Immunol. 3, 293 (1973).

D a n k s a g u n g

Die vorliegende Arbeit wurde im Max-Planck-Institut für molekulare Genetik durchgeführt. Herrn Prof. Dr. Wittmann danke ich für die großzügige Unterstützung, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beitrug.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. G. Stöffler, der mir freizügige Arbeitsmöglichkeiten gewährte und mit wertvollen Diskussionen und Ratschlägen diese Arbeit förderte.

Der Arbeitsgruppe Dr. Stöffler gilt mein Dank für das freundliche Entgegenkommen, das sich nicht nur auf technische Fragen bezog.

L e b e n s l a u f

Als Sohn des selbständigen Tischlermeisters Friedrich Maschler und seiner Ehefrau Margarete, geb. Knappe, wurde ich am 24. 4. 1940 in Carlsruhe, Krs. Oppeln (Schlesien), geboren. Nach der Vertreibung 1945 und einem einjährigen Zwischenaufenthalt in Sachsen, siedelten meine Mutter und ich nach Oldenburg (Oldb.) über, wo wir mit meinem aus russischer Kriegsgefangenschaft zurückgekehrten Vater wieder zusammentrafen.

In Oldenburg besuchte ich die Grundschule, den Mittelschulaufbauzug bis zur mittleren Reife und schloß meine Bau- und Möbeltischlerlehre mit der Gesellenprüfung ab. Danach arbeitete ich als Geselle im inzwischen wieder neu-geschaffenen väterlichen Betrieb und praktizierte in einer Zimmerei, einer Möbelfabrik und einem Architekturbüro.

Von 1962 bis 1965 besuchte ich das Abendgymnasium in Oldenburg. Tagsüber arbeitete ich in einem Konstruktionsbüro für Luft- und Raumfahrt (Dipl. Ing. W. Reyle). Nach dem Abitur nahm ich, einem alten Wunsche folgend, das Studium der Biologie, Hauptfach Zoologie, an der Freien Universität Berlin auf. Meine Dissertationsarbeit begann ich im Sommer 1970 am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H.G. Wittmann.

Reinhard Maschler

